

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología y Terapéutica



**“FARMACOGENÉTICA DEL CLOPIDOGREL EN  
PACIENTES SOMETIDOS A NEUROINTERVENCIÓN  
PERCUTÁNEA”**

Tesis Doctoral

Miriam Saiz Rodríguez

Madrid, 2019



Departamento de Farmacología y Terapéutica

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

Don Francisco Abad Santos, Profesor Titular del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe de Sección del Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario de la Princesa y, Doña Carmen Belmonte Campillo, Investigadora Doctora de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario de La Princesa, CERTIFICAN:

Que Doña Miriam Saiz Rodríguez, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación “FARMACOGENÉTICA DEL CLOPIDOGREL EN PACIENTES SOMETIDOS A NEUROINTERVENCIÓN PERCUTÁNEA” con objeto de obtener el Grado de Doctor.

Como directores del trabajo hacemos constar que ha sido realizado con todas las garantías técnicas y metodológicas, y que las conclusiones obtenidas son plenamente válidas, siendo considerado, por tanto, apto para ser presentado como Tesis Doctoral.

En Madrid, a 6 de mayo de 2019

Fdo. Dr. Francisco Abad Santos

Fdo. Dra. Carmen Belmonte Campillo

A mis padres.

A mi hermana.

A Nuño.

---

“La ignorancia genera confianza más frecuentemente que el conocimiento. Son aquellos que saben poco, y no esos que saben más, quienes tan positivamente afirman que este o aquel problema nunca será resuelto por la ciencia.”

-Charles Darwin-

ÍNDICE DE TABLAS.....	11
ÍNDICE DE FIGURAS.....	13
ABREVIATURAS .....	15

## **RESUMEN** **21**

## **I. INTRODUCCIÓN** **29**

1. VARIABILIDAD EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....	31
2. FARMACOGENÉTICA Y MEDICINA DE PRECISIÓN .....	35
2.1. CONCEPTO E HISTORIA DE LA FARMACOGENÉTICA	35
2.2. VARIACIONES GENÉTICAS	36
2.3. FARMACOGENES	40
2.4. TIPOS DE ESTUDIOS FARMACOGENÉTICOS	45
2.5. HACIA UNA MEDICINA DE PRECISIÓN	46
3. NEUROINTERVENCIONISMO PERCUTÁNEO.....	53
3.1. ANEURISMAS CEREBRALES	54
3.2. INFARTO CEREBRAL	56
3.3. ESTENOSIS CAROTÍDEA	57
4. TRATAMIENTO ANTIAGREGANTE .....	58
4.1. ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	59
4.2. TIENOPIRIDINAS: TICLOPIDINA Y CLOPIDOGREL	60
4.3. CLOPIDOGREL	62
4.4. FARMACOGENÉTICA DEL CLOPIDOGREL	65
4.5. FARMACOGENÉTICA DEL CLOPIDOGREL EN PACIENTES SOMETIDOS A PROCESOS NEUROINTERVENCIONISTAS	77
4.6. USO DE MEDICACIÓN CONCOMITANTE. INHIBIDORES DE LA BOMBA DE PROTONES.	80
5. JUSTIFICACIÓN .....	81

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS** **85**

1. HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	87
2. OBJETIVOS .....	88
2.1. OBJETIVO GENERAL	88
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	88

## **III. MATERIAL Y MÉTODOS** **91**

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	93
1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	93
1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	93
2. INFORMACIÓN RECOGIDA .....	93
2.1. VARIABLES DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS	93
2.2. DESENLACE CLÍNICO	94
2.3. RESPUESTA ANTIPLAQUETARIA	95
3. GENOTIPADO .....	97
3.1. EXTRACCIÓN DE ADN	97
3.2. SELECCIÓN DE POLIMORFISMOS	97



3.3. GENOTIPADO MEDIANTE SONDAS DE HIBRIDACIÓN	99
3.4. GENOTIPADO MEDIANTE SISTEMA MASSARRAY	103
3.5. GENOTIPADO MEDIANTE SONDAS TAQMAN	106
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	108
4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS	108
4.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS PREVIAS AL TRATAMIENTO CON CLOPIDOGREL	110
4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DURANTE EL TRATAMIENTO CON CLOPIDOGREL	110
5. CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	112

#### **IV. RESULTADOS 115**

1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS .....	118
2. TRATAMIENTO NEUROINTERVENCIONISTA .....	120
3. DESENLACE CLÍNICO DE LOS PACIENTES .....	121
3.1. EFECTO SOBRE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA	121
3.2. INCIDENCIA DE EVENTOS ISQUÉMICOS Y HEMORRÁGICOS DURANTE EL TRATAMIENTO CON CLOPIDOGREL	124
4. INFLUENCIA DEL USO DE MEDICACION CONCOMITANTE .....	126
5. INFLUENCIA DEL FENOTIPO DE CYP2C19 EN EL EFECTO DE CLOPIDOGREL EN PACIENTES SOMETIDOS A NEUROINTERVENCIÓN PERCUTÁNEA .....	127
5.1. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE CYP2C19	127
5.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS EN LOS DISTINTOS FENOTIPOS DE CYP2C19	128
5.3. INFLUENCIA DE CYP2C19 EN LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA Y DESENLACE CLÍNICO	129
5.4. EFECTO DE CYP2C19 SOBRE LA INCIDENCIA DE EVENTOS CLÍNICOS	131
5.5. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON IBP EN LOS DISTINTOS FENOTIPOS DE CYP2C19	134
6. INFLUENCIA DE ENZIMAS CYP450, CES1, PON1, ABCB1 Y P2RY12 EN EL EFECTO DE CLOPIDOGREL EN PACIENTES SOMETIDOS A NEUROINTERVENCIÓN PERCUTÁNEA .....	137
6.1. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE TODOS LOS GENES ANALIZADOS	138
6.2. INFLUENCIA DE LAS ENZIMAS CYP450	142
6.3. INFLUENCIA DE LAS ENZIMAS CES1 Y PON1	144
6.4. INFLUENCIA DEL TRANSPORTADOR GLICOPROTEÍNA-P	145
6.5. INFLUENCIA DEL RECEPTOR P2Y12	145
7. RESULTADOS DEL ANÁLISIS MULTIVARIANTE .....	147

#### **V. DISCUSIÓN 151**

1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS .....	153
2. TRATAMIENTO NEUROINTERVENCIONISTA .....	153
3. DESENLACE CLINICO DE LOS PACIENTES .....	154
3.1. EFECTO SOBRE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA	154
3.2. INCIDENCIA DE EVENTOS ISQUÉMICOS Y HEMORRÁGICOS DURANTE EL TRATAMIENTO CON CLOPIDOGREL	156
4. INFLUENCIA DEL USO DE MEDICACIÓN CONCOMITANTE .....	157
5. INFLUENCIA DE LA ENZIMA CYP2C19 .....	159
5.1. INFLUENCIA DEL ALELO CYP2C19*2	160
5.2. INFLUENCIA DEL ALELO CYP2C19*17	161
5.3. INFLUENCIA DEL GENOTIPO DE CYP2C19 Y EL USO DE IBP	163
5.4. ALTERNATIVA AL TRATAMIENTO CON CLOPIDOGREL	165

6. INFLUENCIA DE LAS ENZIMAS CYP450, CES1 Y PON1 .....	167
6.1. INFLUENCIA DE LAS ENZIMAS CYP .....	167
6.2. INFLUENCIA DE CES1 .....	168
6.3. INFLUENCIA DE PON1 .....	169
7. INFLUENCIA DEL TRANSPORTADOR GLICOPROTEÍNA-P .....	170
8. INFLUENCIA DEL RECEPTOR P2Y12 .....	171
9. LIMITACIONES DEL ESTUDIO .....	172
10. PERSPECTIVAS DE FUTURO .....	173
 <b><u>VI. CONCLUSIONES</u></b> .....	<b>177</b>
 <b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	<b>181</b>
 <b><u>AGRADECIMIENTOS</u></b> .....	<b>201</b>
 <b><u>ANEXOS</u></b> .....	<b>207</b>
 ANEXO I. PUBLICACIONES DE LA TESIS DOCTORAL .....	209
ANEXO II. OTRAS PUBLICACIONES EN FARMACOGENÉTICA.....	247

## Índice de tablas

Tabla 1. Listado de los 66 farmacogenes incluidos como VIP en PhamGKB.....	40
Tabla 2. Principales farmacogenes considerados por la plataforma PharmaADME.....	41
Tabla 3. Parejas fármaco-gen para las cuales existe guía de práctica clínica elaborada por el Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC).....	50
Tabla 4. Frecuencias de los alelos de <i>CYP2C19</i> en los principales grupos étnicos. ....	67
Tabla 5. Listado de genes y polimorfismos analizados, tipo de variante y consecuencias funcionales.....	98
Tabla 6. Análisis multivariante mediante regresión lineal y regresión logística .....	111
Tabla 7. Características clínicas de los pacientes.....	119
Tabla 8. Tipo de intervenciones realizadas de acuerdo con el sexo .....	121
Tabla 9. Desenlace clínico de los pacientes de acuerdo con el sexo .....	121
Tabla 10. Influencia de los factores de riesgo cardiovascular sobre el valor de agregometría y el porcentaje de pacientes respondedores a clopidogrel .....	124
Tabla 11. Comparación del valor de agregometria en los pacientes que tuvieron eventos isquémicos o hemorrágicos. ....	125
Tabla 12. Incidencia de eventos clínicos posteriores .....	125
Tabla 13. Frecuencias alélicas de <i>CYP2C19</i> en nuestra población en comparación con población caucásica y española.....	127
Tabla 14. Frecuencias genotípicas y fenotípicas de <i>CYP2C19</i> en nuestra población ..	127
Tabla 15. Presencia de factores de riesgo cardiovascular, tratamiento concomitante y eventos previos de los pacientes en base a su fenotipo metabolizador de <i>CYP2C19</i> ..	128
Tabla 16. Tipo de intervenciones realizadas de acuerdo al fenotipo de <i>CYP2C19</i> .....	129
Tabla 17. Efecto sobre la agregación plaquetaria y la duración del tratamiento de los pacientes de acuerdo con su fenotipo <i>CYP2C19</i> .....	129
Tabla 18. Incidencia de eventos clínicos posteriores en base al fenotipo metabolizador de <i>CYP2C19</i> .....	131
Tabla 19. Influencia del tratamiento concomitante con IBP en el valor de agregometría y en la incidencia de eventos clínicos acorde a los distintos fenotipos de <i>CYP2C19</i> ...	135
Tabla 20. Frecuencias genotípicas de los genes analizados.....	138
Tabla 21. Influencia de las enzimas <i>CYP450</i> en el valor de agregometría .....	142

Tabla 22. Influencia de las enzimas CYP450 en la incidencia de eventos clínicos.....	143
Tabla 23. Influencia de las enzimas CES1 y PON1 en el valor de agregometría y en la incidencia de eventos clínicos.....	144
Tabla 24. Influencia del haplotipo del transportador ABCB1 en el valor de agregometría y en la incidencia de eventos clínicos.....	145
Tabla 25. Influencia del haplotipo del receptor P2RY12 en el valor de agregometría y en la incidencia de eventos clínicos.....	146
Tabla 26. Regresión lineal con valor de agregometría como variable dependiente...	148
Tabla 27. Regresión logística con la variable respondedor como variable dependiente .....	148
Tabla 28. Regresión logística con la incidencia de eventos isquémicos como variable dependiente. ....	148
Tabla 29. Regresión logística con la incidencia de eventos hemorrágicos como variable dependiente. ....	148
Tabla 30. Dosis recomendada de clopidogrel en pacientes con genotipo CYP2C19 conocido y tratamiento concomitante con omeprazol y pantoprazol.....	164

## Índice de figuras

Figura 1. Ejemplo de una curva dosis-respuesta.....	32
Figura 2. Ejemplo de una curva farmacocinética concentración-tiempo.....	33
Figura 3. Farmacocinética. Principios de ADME.....	34
Figura 4. Polimorfismo de una sola base o SNP, <i>single nucleotide polymorphism</i> .....	37
Figura 5. Nomenclatura de la superfamilia del citocromo P450. ....	42
Figura 6. Principales enzimas del citocromo P450, implicación en el metabolismo de fármacos y los principales factores que modulan su actividad.....	43
Figura 7. Planes y Estrategias en Medicina Personalizada, de Precisión o Medicina Genómica en varios países. ....	48
Figura 8. Hemorragia subaracnoidea secundaria a la rotura de un aneurisma.....	55
Figura 9. Procesos de embolización de un aneurisma mediante la colocación de (a) coils o (b) stent. ....	56
Figura 10. Angioplastia e implantación de stent en arteria carótida. ....	58
Figura 11. Estructura química de (a) ticlopidina y (b) clopidogrel. ....	61
Figura 12. Mecanismo de acción de clopidogrel.....	63
Figura 13. Ilustración de la vía metabólica del clopidogrel. ....	65
Figura 14. Contexto genético del gen <i>CYP2C19</i> y los polimorfismos estudiados. ....	66
Figura 15. Recomendaciones del CPIC para el tratamiento con clopidogrel en pacientes con síndrome coronario agudo sometidos a intervención coronaria percutánea.....	70
Figura 16. Contexto genético de los genes <i>CYP2C9</i> y <i>CYP2C8</i> . ....	71
Figura 17. Contexto genético de <i>CYP3A4</i> y <i>CYP3A5</i> .....	72
Figura 18. Contexto genético de <i>CYP1A2</i> .....	73
Figura 19. Contexto genético de <i>CYP2B6</i> .....	73
Figura 20. Contexto genético de <i>PON1</i> . ....	74
Figura 21. Contexto genético de <i>CES1</i> . ....	75
Figura 22. Contexto genético de <i>ABCB1</i> .....	75
Figura 23. Contexto genético de <i>P2RY12</i> .....	76

Figura 24. Esquema de la detección de los niveles de bloqueo del receptor plaquetario P2Y <sub>12</sub> con el sistema VerifyNow.....	96
Figura 25. Esquema que muestra los pasos que tienen lugar en un ciclo de PCR a tiempo real, usando tecnología HybProbe.....	100
Figura 26. Ejemplo de genotipado mediante curvas (a) y picos de fusión (b).....	101
Figura 27. Flujo de trabajo con la plataforma MassARRAY. ....	103
Figura 28. Proceso de MALDI-TOF en MassARRAY.....	105
Figura 29. Ejemplo de resultado de genotipado con MassARRAY Typer Analyzer.....	106
Figura 30. Esquema de una qPCR con los ensayos TaqMan .....	107
Figura 31. Ejemplo de gráfico de discriminación alélica.....	108
Figura 32. Pirámide poblacional de nuestra población de estudio.....	118
Figura 33. Valor de agregometría en base al tipo de intervención realizada. ....	122
Figura 34. Valor de agregometría según el fenotipo de CYP2C19.....	130
Figura 35. Tiempo hasta la aparición de un evento isquémico estudiado mediante análisis de supervivencia de Kaplan-Meier.....	132
Figura 36. Tiempo hasta la aparición de un evento hemorrágico estudiado mediante análisis de supervivencia de Kaplan-Meier.....	133
Figura 37. Tasa de consumo de IBP en los distintos fenotipos de CYP2C19.....	134
Figura 38. Valor de agregometría en los fenotipos de CYP2C19 de acuerdo al tratamiento con IBP.....	136

## Abreviaturas

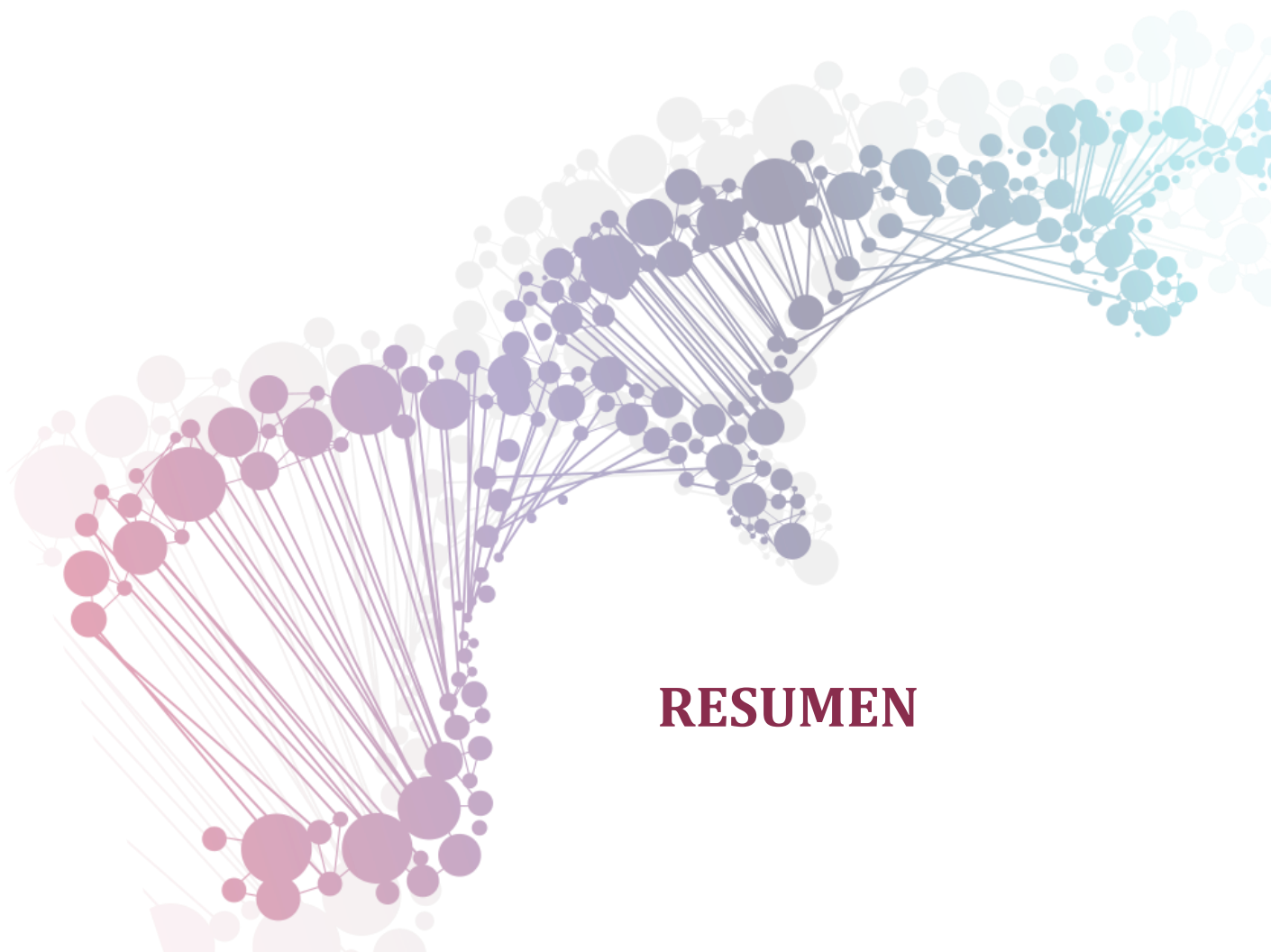
<b>A</b>	Adenina
<b>ABC</b>	Familia de transportadores dependientes de ATP, del inglés <i>ATP-Binding Casette</i>
<b>ACO</b>	Anticoagulantes orales
<b>ADME</b>	Absorción, distribución, metabolismo y excreción
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>ADS</b>	Programa de diseño de experimentos, del inglés <i>Assay Design Suite</i>
<b>AEMPS</b>	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
<b>AINE</b>	Antiinflamatorio no esteroideo
<b>AIT</b>	Accidente isquémico transitorio
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>AUC</b>	Área bajo la curva concentración-tiempo, del inglés <i>area under the curve</i>
<b>C</b>	Citosina
<b>CEGEN</b>	Centro Nacional de Genotipado
<b>CEIm</b>	Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos
<b>CES1</b>	Carboxilesterasa 1
<b>C<sub>max</sub></b>	Concentración máxima de fármaco
<b>CNV</b>	Variaciones en el número de copias, del inglés <i>copy-number variation</i>
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>CPIC</b>	Consorcio para la implementación de la farmacogenética, del inglés <i>Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium</i>
<b>CYP</b>	Citocromo P450
<b>DL</b>	Desequilibrio de ligamiento

<b>DPYD</b>	Dihidropirimidina deshidrogenasa
<b>DS</b>	Desviación estándar
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EPOC</b>	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
<b>EZ</b>	Enzima
<b>FDA</b>	Agencia Reguladora de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos, del inglés <i>Food and Drug Administration</i>
<b>FRCV</b>	Factor de riesgo cardiovascular
<b>FRET</b>	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, del inglés <i>fluorescence resonance energy transfer</i>
<b>G</b>	Guanina
<b>GSTM1</b>	Glutación S-Transferasa Mu 1
<b>GSTP1</b>	Glutación S-transferasa P 1
<b>GSTT1</b>	Glutación S-transferasa theta 1
<b>GWAS</b>	Estudio de asociación de genoma completo, del inglés <i>genome wide association study</i>
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad, del inglés <i>high density lipoprotein</i>
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano, del inglés <i>Human Leukocyte Antigen</i>
<b>HM</b>	Hemorrágico
<b>HSA</b>	Hemorragia subaracnoidea
<b>HybProbe</b>	Sondas de hibridación
<b>IBP</b>	Inhibidores de la bomba de protones
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>IM</b>	Metabolizadores intermedios, del inglés <i>intermediate metabolizers</i>
<b>Indels</b>	Inserciones y deleciones
<b>IQ</b>	Isquémico
<b>ISRS</b>	Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina
<b>M/Z</b>	Masa/carga



<b>MAF</b>	Frecuencia del alelo minoritario, del inglés <i>minor allele frequency</i>
<b>MALDI</b>	Desorción/ionización láser asistida por matriz, del inglés <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
<b>MDR/TAP</b>	Transportador de resistencia a fármacos, del inglés <i>Multidrug resistance, Transporter associated to Antigen Processing</i>
<b>NAT</b>	N-acetiltransferasa
<b>NGS</b>	Secuenciación masiva, del inglés <i>next-generation sequencing</i>
<b>NM</b>	Metabolizadores normales, del inglés <i>normal metabolizers</i>
<b>P2Y</b>	Receptor purinérgico
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>polymerase chain reaction</i>
<b>P-gp</b>	Glicoproteína-P
<b>PGRN</b>	Red de investigación en farmacogenética, del inglés <i>Pharmacogenomics Research Network</i>
<b>PharmGKB</b>	Base de datos de información farmacogenómica, del inglés <i>The Pharmacogenomics Knowledge Base</i>
<b>PharmVar</b>	Consortio de variaciones en farmacogenes, del inglés <i>The Pharmacogene Variation Consortium</i>
<b>PM</b>	Metabolizadores lentos, del inglés <i>poor metabolizers</i>
<b>PON1</b>	Paraoxonasa-1
<b>PRU</b>	Unidades de reacción de P2Y <sub>12</sub> , del inglés <i>P2Y<sub>12</sub> reaction unit</i>
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real o cuantitativa
<b>R lin</b>	Regresión lineal
<b>R Log</b>	Regresión logística
<b>RAM</b>	Reacción adversa medicamentosa
<b>RM</b>	Metabolizadores rápidos, del inglés <i>rapid metabolizers</i>
<b>SAP</b>	Del inglés shrimp alkaline phosphatase
<b>SLC</b>	Transportador de solutos
<b>SLCO</b>	Transportador de solutos orgánicos

<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	Polimorfismos de un solo nucleótido, del inglés <i>single nucleotide polymorphism</i>
<b>SULT1A1</b>	Sulfotransferasa 1A 1
<b>T</b>	Timina
<b>T<sub>1/2</sub></b>	Vida media plasmática del fármaco
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de fusión o <i>melting</i>
<b>T<sub>max</sub></b>	Tiempo hasta alcanzar la concentración máxima de fármaco
<b>TOF</b>	Tiempo de vuelo, del inglés <i>time-of-flight</i>
<b>TPMT</b>	Tiopurina S-metiltransferasa
<b>Transp</b>	Transportador
<b>Tto</b>	Tratamiento
<b>UGT</b>	Urocinadifosfato glucuroniltransferasa
<b>UM</b>	Metabolizadores ultrarrápidos, del inglés <i>ultra-rapid metabolizers</i>
<b>UTR</b>	Regiones no traducidas del ADN, del inglés <i>untranslated regions</i>
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>VIP</b>	Farmacogen muy importante, del inglés <i>very important pharmacogene</i>
<b>VKORC1</b>	Complejo Vitamina K epóxido reductasa
<b>VNTR</b>	Repeticiones en tándem de una secuencia de nucleótidos, del inglés <i>variable number of tandem repeats</i>



## **RESUMEN**

Algunas afecciones neurovasculares, como el aneurisma cerebral y la estenosis carotídea, son tratadas con procedimientos neurointervencionistas mediante la implantación de *stents* o *coils* en las arterias carótidas, vertebrales o craneales. Para minimizar el riesgo de complicaciones tromboembólicas es necesario el uso de doble antiagregación con clopidogrel y ácido acetilsalicílico.

El clopidogrel es un profármaco que ejerce su acción antiagregante una vez metabolizado a través de las enzimas del citocromo P450 (CYP). Aproximadamente el 85% del profármaco es metabolizado por la carboxilesterasa 1 (CES1) a su forma inactiva. El 15% restante es metabolizado a través de CYP2C19, CYP2B6, CYP1A2, CYP3A4, CYP3A5, CYP2C8, CYP2C9 y paraoxonasa-1 (PON1) a su forma activa. Una vez metabolizado, el compuesto activo tiol actúa sobre el receptor P2Y<sub>12</sub>, inhibiendo la activación y agregación plaquetaria. A su vez, la cantidad de clopidogrel y metabolito activo está limitada por el transportador glicoproteína-P.

La doble terapia antiagregante disminuye la aparición de acontecimientos adversos vasculares en un 75-80%. Sin embargo, hay un subgrupo de pacientes no respondedores a clopidogrel que se estima del 66% en pacientes neurointervenidos. Los polimorfismos en los genes implicados en la absorción, metabolismo y mecanismo de acción de clopidogrel podrían contribuir a explicar esa variabilidad en la respuesta. En estudios en pacientes coronarios el gen *CYP2C19* ha demostrado tener un papel relevante. Sin embargo, hasta la fecha, no hay estudios que evalúen el papel de estos polimorfismos en pacientes neurointervenidos.

Este es un estudio observacional retrospectivo que evalúa la respuesta antiplaquetaria y la incidencia de eventos hemorrágicos y/o isquémicos en pacientes tratados con clopidogrel tras una neurointervención percutánea, y su relación con 35 polimorfismos en los genes *CYP2C19*, *CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2C9*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CES1*, *PON1*, *ABCB1* y *P2RY12*.

Este estudio confirma que *CYP2C19* es la enzima más importante involucrada en la respuesta a clopidogrel en pacientes neurológicos. El alelo *CYP2C19\*2* se asoció con

una hiporespuesta al clopidogrel, mientras que el alelo *CYP2C19*\*17 fue un factor protector para el desarrollo de eventos isquémicos (odds ratio=0,149; p=0,002), pero un factor de riesgo para el sangrado (odds ratio=3,60; p=0,038). Los pacientes portadores de alelos mutados de *ABCB1* mostraron un menor valor de agregometría, demostrando que la absorción de clopidogrel está claramente influenciada por la glicoproteína-P. De hecho, el porcentaje de respondedores fue significativamente mayor en pacientes con el haplotipo mutado en comparación con los *wild-type* (80,8% vs. 43,3%; p=0,009). Los pacientes con genotipo *CES1* G143E C/T mostraron un valor de agregometría considerablemente menor ( $59,0 \pm 21,2$  PRU vs.  $165,2 \pm 86,0$  PRU en pacientes *wild-type*), lo que sugiere una mayor formación de metabolito activo, aunque esta diferencia no alcanzó la significación estadística (p=0,084) porque solo había dos pacientes portadores de la mutación. No se encontró relación entre los polimorfismos en otras enzimas *CYP*, *PON1* o *P2RY12* y la respuesta al clopidogrel. Por otro lado, la edad y el tratamiento concomitante con inhibidores de la bomba de protones fueron predictores de peor respuesta a clopidogrel. Además, la intervención con un derivador de flujo fue un factor predictor de una mejor respuesta, en comparación con las intervenciones con stent o coils.

Las guías terapéuticas recomiendan que los metabolizadores intermedios y lentos del *CYP2C19* con síndromes coronarios agudos sometidos a intervención coronaria percutánea reciban un tratamiento antiplaquetario alternativo; sin embargo, el tratamiento guiado por el genotipo no es una recomendación estándar para las afecciones neurovasculares. Este es el primer estudio que realiza un análisis conjunto de *CYP2C19* y otros genes implicados en el tratamiento con clopidogrel en esta cohorte de pacientes. Nuestros hallazgos apoyan un genotipado rutinario de pacientes tratados con clopidogrel. Además, aconsejamos considerar una terapia antiplaquetaria alternativa en los metabolizadores intermedios y lentos de *CYP2C19*, por una mala respuesta a clopidogrel, y en los ultrarrápidos, por el riesgo de sangrado. Asimismo, los polimorfismos de *ABCB1* y *CES1* podrían considerarse para un mejor enfoque farmacogenético.

## ABSTRACT

Some neurovascular conditions, such as cerebral aneurysm and carotid stenosis, are treated by neurointerventionism through the implantation of stents or coils in the carotid, vertebral or cranial arteries. To minimize the risk of thromboembolic complications, it is necessary to use double antiaggregation treatment with clopidogrel and acetylsalicylic acid.

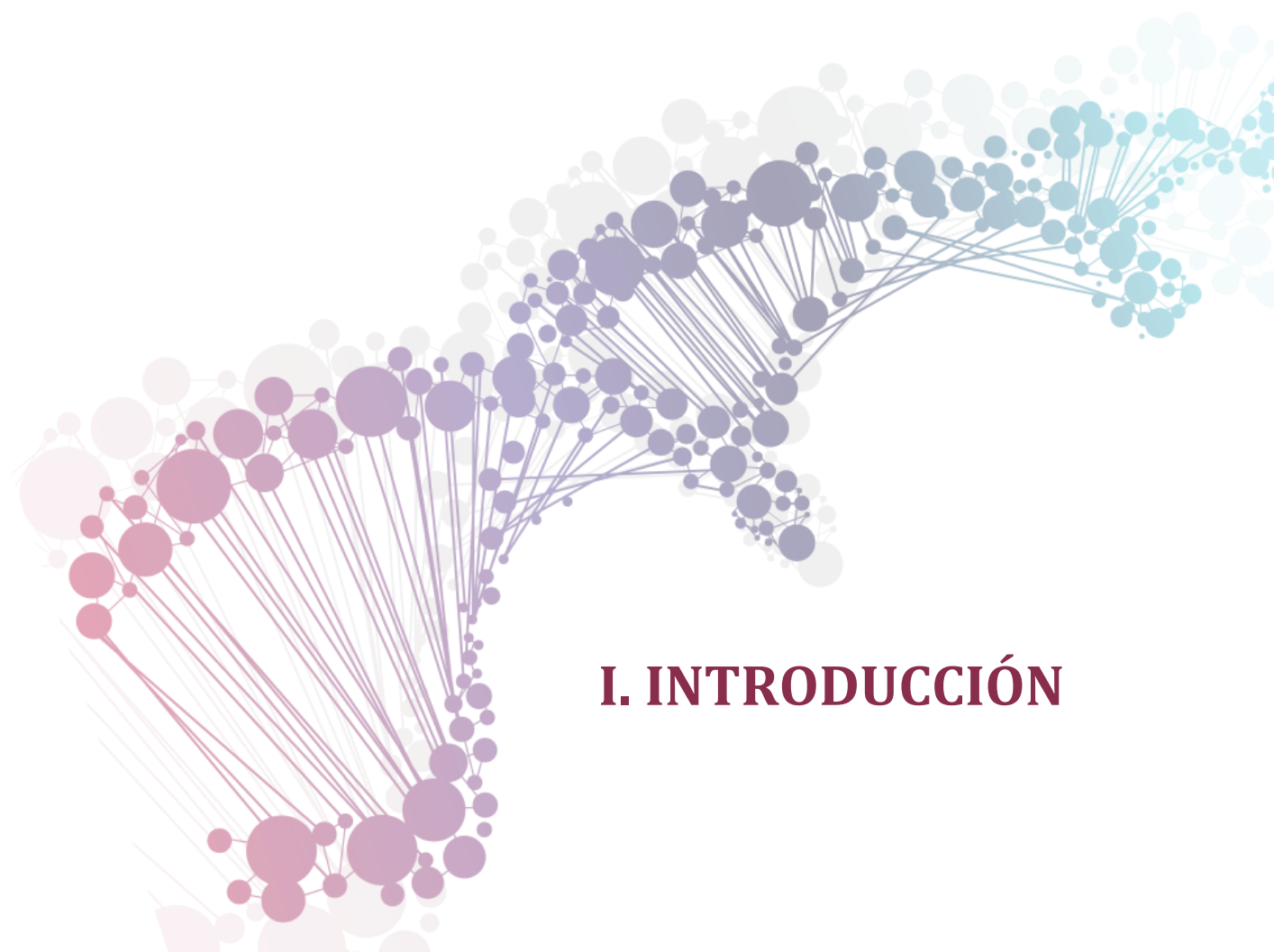
Clopidogrel is a prodrug that exerts its anti-aggregating action once metabolized through cytochrome P450 (CYP) enzymes. Approximately 85% of the prodrug is metabolized by carboxylesterase 1 (CES1) to its inactive form. The remaining 15% is metabolized through CYP2C19, CYP2B6, CYP1A2, CYP3A4, CYP3A5, CYP2C8, CYP2C9 and paraoxonase-1 (PON1) to its active form. Once metabolized, the active thiol compound acts on the P2Y<sub>12</sub> receptor, thus inhibiting platelet activation and aggregation. In addition, the amount of clopidogrel and its active metabolite is limited by the transporter P-glycoprotein.

The double antiaggregation therapy decreases the incidence of adverse vascular events by 75-80%. However, there is a clopidogrel non-responders subgroup of about 66% of neurointervened patients. Polymorphisms in genes involved in clopidogrel absorption, metabolism and mechanism of action may contribute to explain this variability in response. In studies with coronary patients, the gene *CYP2C19* has been shown to play a relevant role. However, to date, there are no studies evaluating the role of these polymorphisms in neurointervened patients.

This is a retrospective observational study that evaluates the antiplatelet response and the incidence of haemorrhagic and/or ischemic events in patients treated with clopidogrel after percutaneous neurointervention, related to 35 polymorphisms in the genes *CYP2C19*, *CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2C9*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CES1*, *PON1*, *ABCB1* and *P2RY12*.

This study confirms that CYP2C19 is the most important enzyme involved in clopidogrel response in neurological patients. The carriage of *CYP2C19*\*2 allele was associated with clopidogrel hyporesponse, while the *CYP2C19*\*17 allele was a protective factor for the development of ischemic events (odds ratio=0.149; p=0.002), but a risk factor for bleeding (odds ratio=3.60; p=0.038). Patients with *ABCB1* mutated alleles showed a lower aggregation value, demonstrating that clopidogrel absorption is clearly influenced by P-glycoprotein. In fact, the percentage of responders was significantly higher in patients with the mutated haplotype compared to wild-type (80.8% vs. 43.3%; p=0.009). Patients with *CES1* G143E C/T genotype showed a considerably lower aggregation value ( $59.0 \pm 21.2$  PRU vs.  $165.2 \pm 86.0$  PRU in wild-type patients). Although this difference was not significant (p=0.084), since only two patients carried the mutation, this finding suggests a higher active metabolite formation. No relation was found between polymorphisms in other *CYP* enzymes, *PON1* or *P2RY12* and clopidogrel response. Finally, age and concomitant treatment with proton pump inhibitors were predictors of worse response to clopidogrel. In addition, intervention with a flow diverter was a predictor of better response compared to interventions with stent or coils.

Therapeutic guidelines recommend that CYP2C19 intermediate and poor metabolizers with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention receive alternative antiplatelet therapy. However, genotype-guided therapy is not a standard recommendation for neurovascular conditions. This is the first study to perform a joint analysis of *CYP2C19* and other genes involved in clopidogrel therapy in this cohort of patients. Our findings support routine genotyping of patients treated with clopidogrel. In addition, we advise to consider an alternative antiplatelet therapy in CYP2C19 intermediate and poor metabolizers, due to a poor response, and in CYP2C19 ultra-rapid metabolizers, due to the risk of bleeding. Furthermore, *ABCB1* and *CES1* polymorphisms could be considered for a better pharmacogenetic approach.



# I. INTRODUCCIÓN



## 1. VARIABILIDAD EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

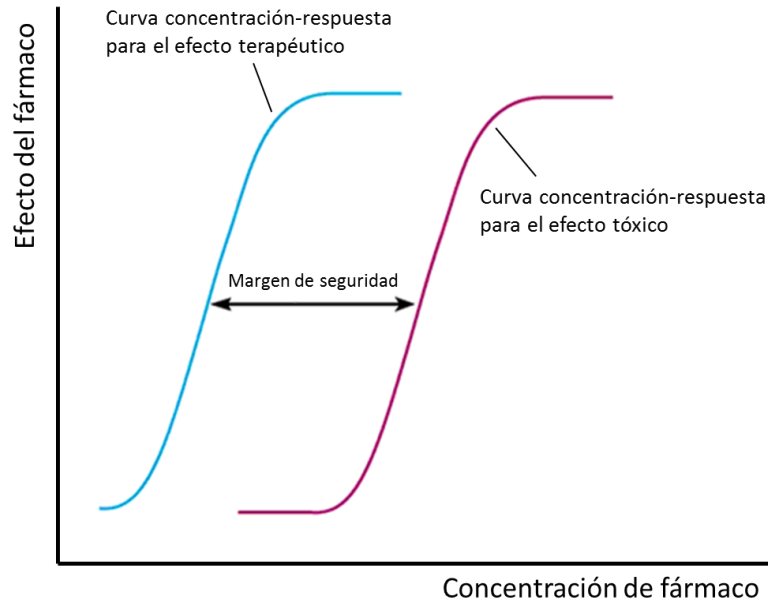
Habitualmente, cuando se administra el mismo fármaco a la misma dosis a un grupo de pacientes con una determinada patología, la mayoría de ellos obtiene una respuesta terapéutica deseada. No obstante, suele haber un subgrupo de pacientes en los que se produce un fallo terapéutico, que puede deberse a una falta de eficacia o al desarrollo de reacciones adversas medicamentosas (RAM). La frecuencia de pacientes a los que el fármaco no les resulta eficaz oscila entre un 20% y un 75%, dependiendo de la patología y el tratamiento <sup>1</sup>. Asimismo, la aparición de algún tipo de RAM supone alrededor de un 7% de los ingresos hospitalarios en países occidentales <sup>2-4</sup>. El objetivo ante cualquier terapia farmacológica deber ser siempre administrar el fármaco más eficaz, con el menor riesgo de efectos adversos y desde el primer momento, reduciendo así los costes y mejorando la calidad asistencial. Controlar esa variabilidad en la respuesta a los fármacos continúa siendo muchas veces un reto en la práctica clínica habitual.

Cuando se prescribe un medicamento, por norma general, se siguen las recomendaciones de dosis establecidas en la ficha técnica esperando que sea eficaz y seguro en todos los pacientes, pero como ya se ha descrito, esto no siempre ocurre así. Existe un margen de dosis entre la que será terapéutica y ejercerá el efecto deseado y la dosis tóxica que va a dar lugar a efectos adversos. De esta forma, una mayor dosis producirá mayor efecto farmacológico pero también aumentará el riesgo de RAM.

La relación entre la concentración del fármaco y su efecto terapéutico y/o tóxico sigue una curva sigmoidea (figura 1), de tal forma que a partir de una determinada concentración comenzarán a producirse los efectos, aumentando a medida que aumente la concentración. La pendiente de la curva se mantiene por un amplio rango de concentración en el que la respuesta es directamente proporcional a la concentración. Posteriormente, se alcanza un límite en el que el aumento de la concentración no produce mayor efecto (punto de eficacia máxima); en este caso por

## I. Introducción

mucho que se aumente la concentración no solo no habrá un aumento de la eficacia, sino que habrá un mayor riesgo de RAM.



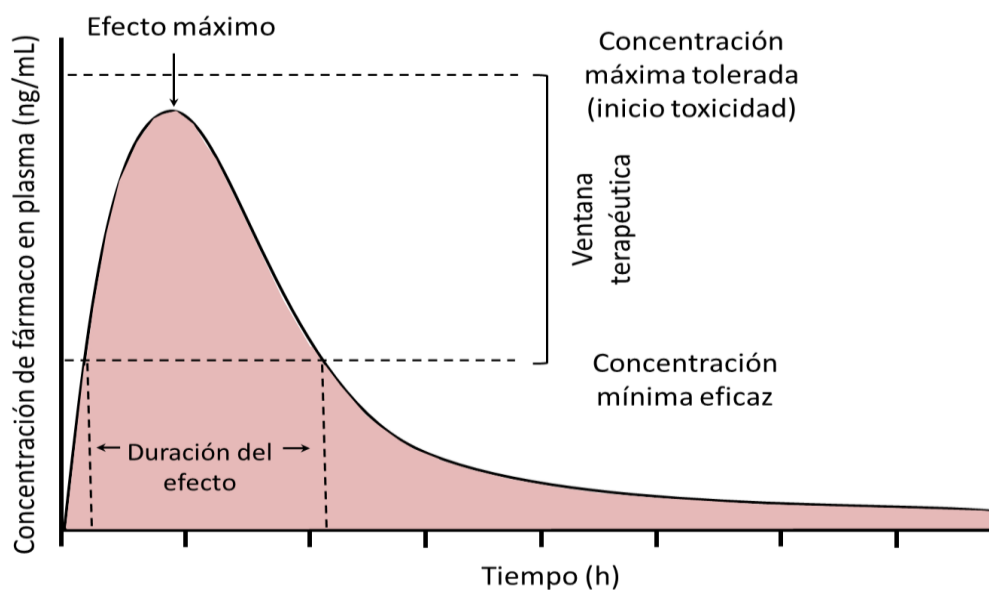
**Figura 1.** Ejemplo de una curva dosis-respuesta.

Se conoce como ventana terapéutica al rango de concentraciones plasmáticas comprendido entre la concentración mínima eficaz (a partir de la cual el fármaco produce el efecto deseado), y la concentración máxima tolerada (a partir de la cual el fármaco resulta tóxico).

El objetivo del tratamiento farmacológico es que las concentraciones plasmáticas se sitúen dentro de la ventana terapéutica. Sin embargo, un metabolismo ralentizado o aumentado de los fármacos puede afectar a las concentraciones plasmáticas tras la administración de dosis habituales, situándose en niveles tóxicos o niveles infraterapéuticos, respectivamente.

La farmacocinética es la rama de la farmacología que estudia los procesos por los cuales pasa un fármaco cuando este se encuentra en el organismo, desde el momento de su administración hasta su eliminación. Tras la administración de un fármaco, se produce una curva de distribución característica (figura 2) que representa la

concentración alcanzada en función del tiempo. La farmacocinética incluye cuatro procesos principales, recogidos en el acrónimo ADME: Absorción (forma en la que el fármaco penetra en el organismo), Distribución (localización del fármaco en el organismo), Metabolismo (modificación química del fármaco) y Excreción (eliminación del fármaco) (figura 3). Por otro lado, la farmacodinamia es la rama de la farmacología que estudia el efecto que tiene el fármaco sobre el organismo. Es decir, se tiene en cuenta el mecanismo de acción del fármaco y permite evaluar la eficacia y seguridad del mismo.



**Figura 2.** Ejemplo de una curva farmacocinética concentración-tiempo.

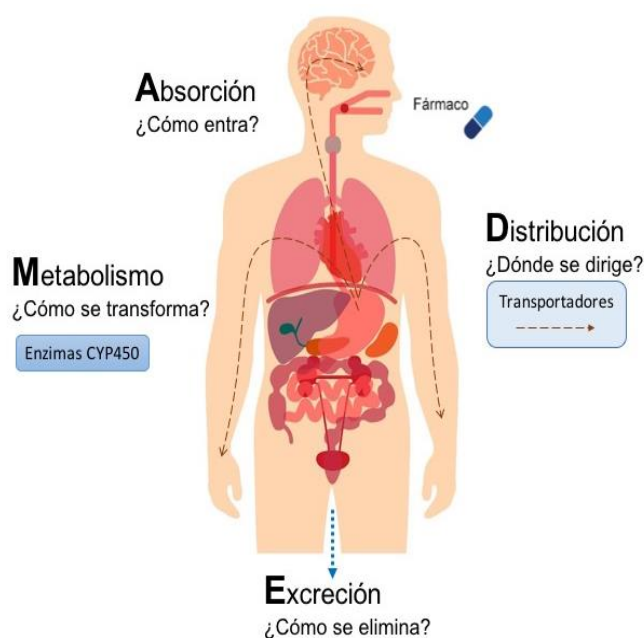
Los fármacos sufren una serie de transformaciones químicas (metabolismo) con el objetivo de facilitar su excreción del organismo. Esta transformación se realiza a través de distintas rutas metabólicas que se clasifican en dos fases:

- ❖ Reacciones de fase I: los fármacos son transformados en compuestos más solubles principalmente mediante reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis. Generalmente, son reacciones de inactivación llevadas a cabo principalmente por la familia enzimática del citocromo P450 (CYP), la cual metaboliza hasta el 75% de

## I. Introducción

los fármacos cuya eliminación es principalmente hepática <sup>5</sup>. Además, en ocasiones catalizan la formación de metabolitos activos y/o tóxicos.

- ❖ Reacciones de fase II: las sustancias polares resultantes de las reacciones de fase I se convierten en sustancias de mayor tamaño para aumentar su hidrosolubilidad y, así, facilitar su eliminación. Se producen reacciones de conjugación con compuestos endógenos muy hidrosolubles catalizadas por transferasas (glucuroniltransferasas, N-acetiltransferasas, sulfoniltransferasas y glutatión S-transferasas). Este proceso conlleva una disminución de la actividad farmacológica y/o toxicológica.



**Figura 3.** Farmacocinética. Principios de ADME.

Ambas fases (I y II) facilitan la eliminación renal o biliar de los metabolitos.

La variabilidad interindividual en la respuesta a los fármacos, tanto en términos de eficacia como de seguridad, es un hecho reconocido desde el comienzo de la medicina. Sin embargo, las causas que originan esa variabilidad entre individuos no están tan firmemente establecidas. En el tratamiento farmacológico, los procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos van a verse afectados por múltiples factores que

van a condicionar la respuesta del paciente. Entre otros, el diagnóstico, la dosis, las posibles interacciones medicamentosas que puedan producirse, factores ambientales y, por último, genéticos. Entre estos últimos, el principal factor que influye en esta variabilidad interindividual es la combinación de múltiples variaciones genéticas que en conjunto originan un fenotipo determinado, ya sea de riesgo a padecer una enfermedad o un perfil de respuesta a un fármaco <sup>6</sup>.

## 2. FARMACOGENÉTICA Y MEDICINA DE PRECISIÓN

### 2.1. Concepto e historia de la farmacogenética

La farmacogenética es la disciplina que estudia las variaciones genéticas que se relacionan con la respuesta a los fármacos. El término “farmacogenética” fue acuñado por primera vez por Vogel en 1959 <sup>7</sup>. Muchos fueron los que desde ese momento describieron la asociación de determinadas variaciones genéticas con diferentes respuestas farmacológicas. Meyer publicó en 2004 una exhaustiva revisión de la historia de la farmacogenética <sup>8</sup>, que demuestra que ya por la segunda mitad del siglo pasado se empezaba a poner de manifiesto que las variaciones en la respuesta a los fármacos podrían deberse, al menos en parte, a la herencia genética <sup>9,10</sup>. Posteriormente, aparecieron múltiples trabajos describiendo la contribución de la genética a la variación en el efecto de los fármacos, centrándose la mayoría de ellos en el efecto sobre la farmacocinética <sup>10</sup>.

Los estudios realizados en la década de los 90 del siglo pasado, se centraron principalmente en las isoformas CYP como una de las principales familias de enzimas metabolizadoras de fármacos. Un ejemplo sería el de la enzima CYP2D6, inicialmente llamada debrisoquina hidroxilasa, la cual se asoció con variaciones en las concentraciones plasmáticas y eficacia de varios fármacos, como la debrisoquina o los antidepresivos tricíclicos <sup>11,12</sup>. Pero no sólo se centraron en enzimas de fase I, sino también en enzimas de fase II, como por ejemplo la enzima tiopurina S-metiltransferasa (TPMT). En este caso, se asoció la variabilidad genética en la enzima

## I. Introducción

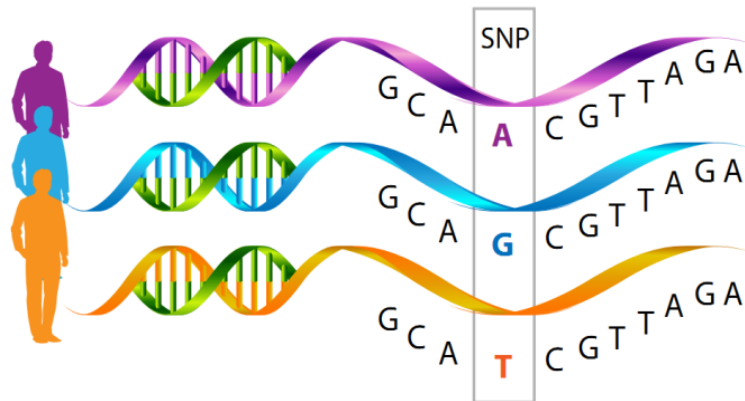
con una mielosupresión potencialmente mortal ante el tratamiento con mercaptopurina y azatioprina (agentes antineoplásicos e inmunosupresores) <sup>13,14</sup>. Ciertas variantes alélicas (*TPMT* \*2, \*3B y \*3C) dan lugar a proteínas que se degradan rápidamente, lo cual se traduce en un descenso de la actividad enzimática, causando a su vez una elevada toxicidad hematopoyética debido a la acumulación de nucleótidos de tioguanina <sup>15</sup>. También se estudió el efecto de otros biomarcadores, además de las enzimas metabolizadoras, como por ejemplo el alelo *HLA-B\*5701*. En este caso, en 2002, se informó de forma independiente por dos grupos de investigación de la asociación entre una reacción de hipersensibilidad a abacavir (un antiretroviral para el tratamiento de las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana, VIH) y el ser portador del alelo *HLA-B\*5701* <sup>16,17</sup>. Posteriormente, el ensayo clínico PREDICT-1 demostró que el genotipado de *HLA-B\*5701* previo al tratamiento con abacavir evita la hipersensibilidad <sup>18</sup>, incluyéndose esta información en la ficha técnica del fármaco <sup>19</sup>.

### 2.2. Variaciones genéticas

Por tanto, como ya se ha mencionado previamente, las variaciones genéticas que se estudian en relación con la respuesta a fármacos se dan principalmente en genes que codifican proteínas que bien pueden ser enzimas metabolizadoras, transportadores, receptores o moléculas diana del fármaco.

Para poder predecir la respuesta a los fármacos es necesario el análisis de biomarcadores genéticos implicados en los procesos farmacocinéticos o farmacodinámicos de los medicamentos. Estos biomarcadores se basan en la presencia de variaciones en la secuencia de ADN, que incluyen: inserciones y deleciones (indels), repeticiones en tándem de una secuencia de nucleótidos (VNTR, del inglés *variable number of tandem repeats*), variaciones en el número de copias (CNV, del inglés *copy-number variation*) y los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*) que afectan a una sola base (adenina (A), timina (T), guanina (G) o citosina (C) de una secuencia de ADN) (figura 4).

Las variaciones más frecuentemente estudiadas en farmacogenética son los polimorfismos, que, a diferencia de las mutaciones puntuales, están presentes en la población con una frecuencia superior al 1%. Los SNP son los polimorfismos genéticos más frecuentes, determinando gran parte de la variabilidad genética entre individuos.



**Figura 4.** Polimorfismo de una sola base o SNP, *single nucleotide polymorphism*

Se conocen varios millones de SNP a lo largo del genoma humano, con una frecuencia aproximada de 1 cada 300 pares de bases, contribuyendo al 90% de la variabilidad genética <sup>20</sup>.

Un alelo es cada una de las dos o más versiones de un gen. Cada individuo hereda dos alelos para cada gen, uno procedente de la madre y otro del padre. Estos alelos se encuentran en la misma posición dentro de los cromosomas homólogos (lo que se conoce como *locus*).

En los cromosomas autosómicos (del 1 al 22) el genotipo para un marcador viene determinado por la combinación de dos alelos en el mismo *locus*. Aquellos sujetos con los dos alelos iguales en un mismo *locus*, uno de cada cromosoma, son conocidos como homocigotos. Los sujetos con dos alelos diferentes en un *locus*, uno en cada cromosoma, son heterocigotos. Por ejemplo, en un SNP que suponga un cambio del alelo “A” por el alelo “G” (A>G), los posibles genotipos o parejas de alelos son:

## I. Introducción

- ❖ A/A (genotipo más frecuente, conocido como silvestre o *wild-type*).
- ❖ A/G (heterocigoto).
- ❖ G/G (genotipo menos frecuente, conocido como mutado).

De este modo, los individuos se pueden clasificar para un determinado SNP como homocigotos *wild-type*, heterocigotos y homocigotos mutados.

Las consecuencias funcionales de estos polimorfismos dependerán de su localización en la secuencia de ADN. Así, los SNP que se localicen en regiones codificantes (exones) pueden ocasionar un cambio sinónimo si no se modifica la cadena de aminoácidos, o un cambio no sinónimo si producen un cambio en la cadena de aminoácidos.

- ❖ Los cambios sinónimos, a pesar de no producir un cambio de aminoácido, pueden tener consecuencias funcionales en la proteína, puesto que se puede ver afectada la estabilidad del transcrito.
- ❖ Dentro de los SNP no sinónimos existen los llamados “*missense*” o de cambio de sentido, en los que el codón resultante codifica para un aminoácido diferente, pudiendo afectar a la funcionalidad proteica, y los llamados “*nonsense*” o sin sentido en los que se produce un codón de parada que va a originar una proteína truncada y normalmente inactiva.

Además, los SNP que se encuentren en regiones no codificantes (intrones) también pueden alterar los procesos de expresión o actividad de las proteínas. Por ejemplo:

- ❖ SNP en la región promotora del gen pueden ocasionar alteraciones en la transcripción.
- ❖ SNP en regiones no traducidas UTR (*untranslated regions*) pueden afectar a la traducción o estabilidad del ácido ribonucleico mensajero (ARNm).
- ❖ SNP en intrones pueden afectar al procesamiento del ARN provocando un ajuste alternativo o *splicing*.



Así, las consecuencias fenotípicas de un SNP están relacionadas con su localización y la naturaleza de la mutación. Puede que no se produzca consecuencia alguna, o que se vea afectada la transcripción y traducción génica, que se produzcan cambios en la estructura de la proteína o sus funciones o cambios en la regulación génica a distintos niveles.

Con el fin de describir los patrones de variación genética entre las distintas poblaciones surgieron varios proyectos como el Consorcio Internacional HapMap (mapeo de haplotipos), que comparaba las secuencias genéticas de diferentes individuos con el objetivo de identificar las regiones cromosómicas con SNP con una frecuencia del alelo minoritario (MAF, del inglés *minor allele frequency*) de al menos el 5% en uno o más grupos étnicos. Sin embargo, era necesario profundizar un poco más para ser capaces de detectar las variaciones raras, donde el Proyecto 1000 Genomes<sup>21</sup> ha sido clave, con la secuenciación del ADN de 2500 individuos, siendo capaces de detectar variaciones con MAF inferior al 1% <sup>22</sup>. Estas plataformas nos permiten conocer las frecuencias genotípicas y alélicas para cada SNP en una determinada población así como definir los patrones de desequilibrio de ligamiento <sup>A</sup> entre los distintos SNP.

Así, los SNP presentes en enzimas metabolizadoras y transportadores podrán afectar a la farmacocinética de los fármacos, mientras que SNP en receptores, canales iónicos u otras moléculas implicadas en el mecanismo de acción de los fármacos pueden afectar a su farmacodinamia. Por tanto, la respuesta a muchos fármacos estará determinada por polimorfismos genéticos que influyan en su farmacocinética y/o farmacodinamia.

---

<sup>A</sup> El desequilibrio de ligamiento (DL) se refiere a la disposición no casual de alelos entre dos *loci* cercanos, de modo que estos alelos se heredarán conjuntamente a lo largo de múltiples generaciones. Esto se debe a que es baja la probabilidad de que entre dos *loci* cercanos exista una recombinación. Por tanto, si un determinado alelo de un SNP se asocia con un fenotipo, es posible que otros alelos de otros SNP cercanos también se asocien con ese fenotipo.

## 2.3. Farmacogenes

Se conocen como farmacogenes a aquellos genes que son de especial interés por estar implicados en el metabolismo o la respuesta a uno o varios fármacos. Generalmente estos farmacogenes desempeñan un papel en el metabolismo de muchos fármacos (como las isoenzimas del citocromo P450) o contienen variantes que potencialmente contribuyen a una respuesta farmacológica tóxica grave (como el *HLA-B\*5701*).

Actualmente hay registrados 66 farmacogenes VIP (del inglés *Very Important Pharmacogene*) en la base de datos PharmGKB (*The Pharmacogenomics Knowledge Base*; <https://www.pharmgkb.org/vips>) (tabla 1). Estos genes se seleccionan a partir de una extensa variedad de fuentes, que incluyen la lista de biomarcadores de la Agencia Reguladora de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA), las fichas técnicas de los medicamentos que contengan información farmacogenética aprobadas por la FDA y las recomendaciones del grupo de expertos que forma el *Clinical Pharmacogenetic Implementation Consortium* (CPIC).

**Tabla 1.** Listado de los 66 farmacogenes incluidos como VIP en PharmGKB.

Gen	Gen	Gen	Gen	Gen	Gen
ABCB1	ALK	CYP2C19	EGFR	KRAS	RYR1
ABCG2	ALOX5	CYP2C8	ERBB2	MT-RNR1	SCN5A
ABL1	BCR	CYP2C9	F5	MTHFR	SLC19A1
ACE	BRAF	CYP2D6	G6PD	NAT2	SLC22A1
ADH1A	BRCA1	CYP2E1	GSTP1	NQO1	SLC01B1
ADH1B	CACNA1S	CYP2J2	GSTT1	NR1I2	SULT1A1
ADH1C	CFTR	CYP3A4	HLA-B	NRAS	TPMT
ADRB1	COMT	CYP3A5	HMGCR	P2RY1	TYMS
ADRB2	CYP1A2	CYP4F2	KCNH2	P2RY12	UGT1A1
AHR	CYP2A6	DPYD	KCNJ11	PTGIS	VDR
ALDH1A1	CYP2B6	DRD2	KIT	PTGS2	VKORC1

Nótese que cada gen está marcado con un hipervínculo que redirige a su resumen en PharmGKB.

De hecho, algunos de estos genes han sido considerados por PharmaADME (<http://pharmaadme.org/joomla/>) (tabla 2), un grupo multidisciplinar de representantes de la industria farmacéutica y centros académicos, de relevancia para

usarlos como biomarcadores genéticos estandarizados ampliamente aplicables a ensayos clínicos. El objetivo es identificar predictores de variabilidad farmacocinética que pudieran afectar a la seguridad y eficacia de los medicamentos durante el proceso de desarrollo de los fármacos. La situación ideal pasa por estudiar los biomarcadores de forma prospectiva en ensayos clínicos de fases tempranas en el desarrollo de un medicamento, para así poder definir los perfiles de administración del fármaco. Desafortunadamente, esto no siempre es posible por lo que esta aproximación, a pesar de ser cada vez más habitual, sigue siendo infrecuente en la actualidad.

**Tabla 2.** Principales farmacogenes considerados por la plataforma PharmaADME

Gen	Clase	Gen	Clase	Gen	Clase
CYP1A1	EZ Fase I	CYP2C19	EZ Fase I	CYP2E1	EZ Fase I
CYP1A2	EZ Fase I	CYP2C8	EZ Fase I	CYP3A4	EZ Fase I
CYP2A6	EZ Fase I	CYP2C9	EZ Fase I	CYP3A5	EZ Fase I
CYP2B6	EZ Fase I	CYP2D6	EZ Fase I	DPYD	EZ Fase I
GSTM1	EZ Fase II	NAT2	EZ Fase II	UGT2B15	EZ Fase II
GSTP1	EZ Fase II	SULT1A1	EZ Fase II	UGT2B17	EZ Fase II
GSTT1	EZ Fase II	TPMT	EZ Fase II	UGT2B7	EZ Fase II
NAT1	EZ Fase II	UGT1A1	EZ Fase II		
ABCB1	Transp	SLC15A2	Transp	SLC22A6	Transp
ABCC2	Transp	SLC22A1	Transp	SLC01B1	Transp
ABCG2	Transp	SLC22A2	Transp	SLC01B3	Transp

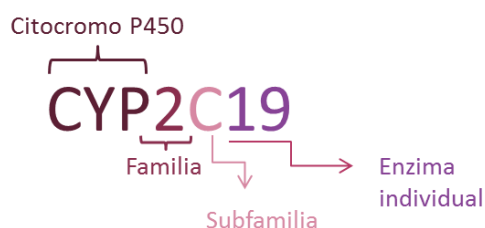
Abreviaturas: CYP, citocromo P450; DPYD, dihidropirimidina deshidrogenasa; EZ, enzima; GSTM1, glutatión S-transferasa Mu 1; GSTP1, glutatión S-transferasa P 1; GSTT1, glutatión S-transferasa theta 1; NAT, N-acetiltransferasa; SULT1A1, sulfotransferasa 1A 1; TPMT, tiopurina metiltransferasa; UGT, uridinadifosfato glucuroniltransferasa; ABC, ATP-binding cassette; SLC, solute carrier; SLCO, solute carrier organic anion transporter; Transp, transportador.

### 2.3.1. Enzimas del citocromo P450

El citocromo P450 es una superfamilia de enzimas responsables del metabolismo por oxidación de compuestos exógenos (xenobióticos) y endógenos <sup>23</sup>. Su localización es mayoritariamente hepática aunque se pueden encontrar en otras localizaciones del organismo como el tracto respiratorio o intestinal <sup>24</sup>. Los genes de esta superfamilia se clasifican en base a la homología de sus secuencias de ADN, dividiéndose así en familias cuando los genes tienen al menos un 40% de similitud en su secuencia, posteriormente en subfamilias cuando tienen al menos un 55% de similitud, y finalmente en enzimas individuales, las cuales difieren en un 3% en su secuencia (figura 5) <sup>25</sup>. Se han descrito 57 genes y alrededor del mismo número de pseudogenes, que se agrupan de acuerdo a su similitud en 18 familias y 44 subfamilias <sup>26</sup>.

Las enzimas metabolizadoras de fármacos más relevantes pertenecen a las familias CYP1, CYP2 y CYP3, siendo las responsables de la mayoría de las biotransformaciones de fase I de fármacos y otros xenobióticos en el hígado humano:

- Familia CYP1: CYP1A1 y CYP1A2
- Familia CYP2: CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP2J2
- Familia CYP3: CYP3A4 y CYP3A5

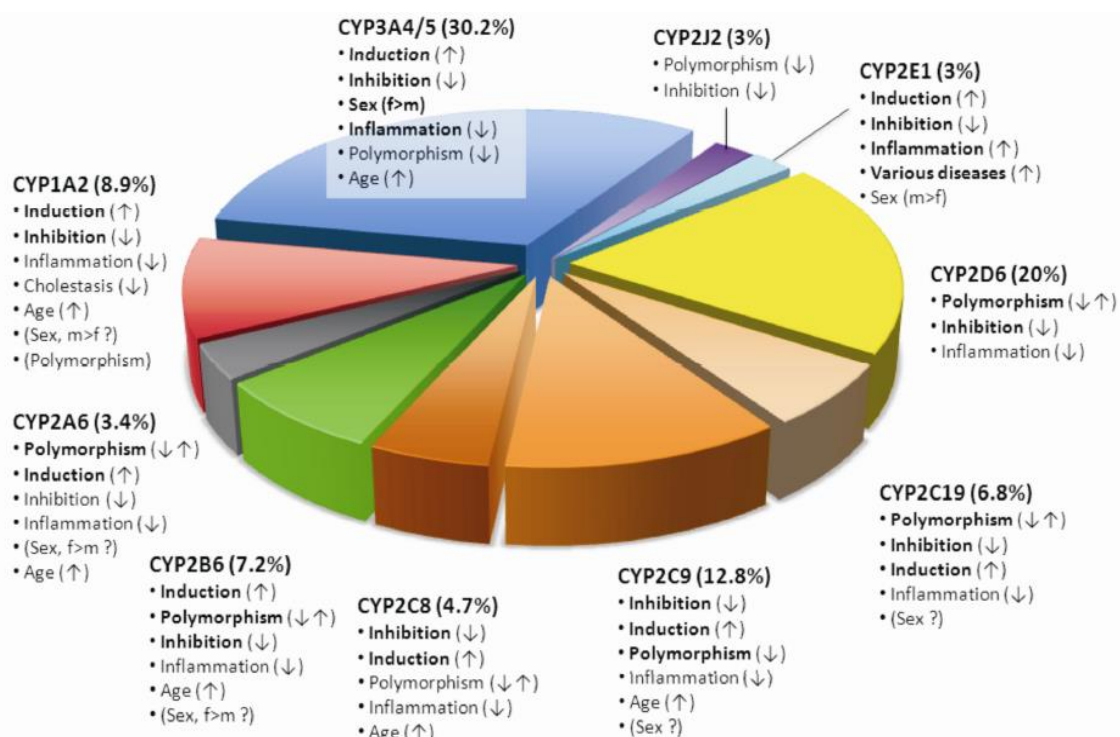


**Figura 5.** Nomenclatura de la superfamilia del citocromo P450.

CYP3A4, CYP2C9, CYP1A2 y CYP2E1 son las isoformas más abundantes en el hígado, expresando hasta 10 veces más niveles de proteínas que el resto <sup>27</sup>. Sin embargo, la contribución de cada isoforma en el metabolismo de los fármacos no depende sólo de la abundancia, sino de la especificidad del sustrato. Por lo que las enzimas más

importantes para el metabolismo son CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 y CYP2C19, responsables de aproximadamente el 80% de las reacciones oxidativas en el metabolismo de los fármacos <sup>28</sup> (figura 6).

Las familias de isoenzimas CYP1, 2 y 3 tienen especificidades de sustrato amplias y muchas veces superpuestas, que generalmente favorecen una eliminación eficaz de xenobióticos lipófilos. Sin embargo, existe cierta variabilidad en su expresión y funciones que conducen a respuestas a los fármacos imprevistas, como toxicidad o falta de respuesta <sup>8,29,30</sup>. Cada isoforma varía en una población determinada, debido a factores genéticos y no genéticos del huésped y numerosos factores ambientales, algunos de los cuales se mantienen constantes a lo largo de la vida (genotipo, sexo) mientras que otros son dinámicos (edad, fármacos administrados, patologías). Estos factores tampoco influyen de igual manera sobre las distintas isoformas. Por ejemplo, la actividad de CYP2D6 se ve principalmente influenciada por los polimorfismos genéticos, mientras que CYP3A4 se ve influido principalmente por el sexo y la inducción o inhibición por una amplia gama de sustancias <sup>27</sup>.



**Figura 6.** Principales enzimas del citocromo P450, implicación en el metabolismo de fármacos y los principales factores que modulan su actividad.

Tomada de Zanger *et al.*, 2014 <sup>27</sup>.

## I. Introducción

En la figura 6 se muestra el porcentaje de contribución de cada una de ellas al metabolismo de fármacos y los distintos factores que influyen en la variabilidad en la actividad de estas enzimas.

Puesto que estas enzimas son tan relevantes en el metabolismo de los fármacos, la variabilidad genética que altere su nivel de expresión o actividad puede tener un importante efecto sobre la eficacia farmacológica.

### 2.3.2. Transportadores

Es de relevancia también el papel de los transportadores, proteínas de membrana que controlan el acceso de sustancias endógenas y xenobióticos (como fármacos) a varias localizaciones del cuerpo humano <sup>31</sup>. Al contrario que las enzimas metabolizadoras de fármacos, que se encuentran principalmente expresadas en el hígado e intestino, los transportadores se encuentran en todos los tejidos. Por esta razón, su papel es relevante en la absorción, distribución y eliminación de los fármacos, influyendo así en su farmacocinética y/o farmacodinamia <sup>32</sup>. El Proyecto Genoma Humano ha identificado más de 400 transportadores pertenecientes a las dos principales superfamilias: la familia de los transportadores dependientes de ATP o ABC (del inglés *ATP-Binding Cassette*) y la familia transportadora de solutos SLC (del inglés *solute carrier*) <sup>32</sup>.

En especial, la familia de los transportadores ABC va a desempeñar una labor fundamental en la absorción de los fármacos en el tracto gastrointestinal o el paso al sistema nervioso central (SNC) a través de la barrera hematoencefálica. En concreto, es relevante el papel del transportador glicoproteína-P (P-gp), una bomba de flujo que transporta una amplia gama de compuestos xenobióticos, expulsándolos fuera del tejido en el que se expresa <sup>33</sup>. Codificada por el gen *ABCB1* (*ATP-binding cassette subfamily B member 1*), se expresa en células epiteliales especializadas de órganos secretores/excretores (hígado, riñones, intestino delgado) y en células de la barrera hematoencefálica o la placenta <sup>34</sup>. Debido a la localización particular de este

transportador, se cree que la P-gp puede tener una implicación en los procesos ADME de múltiples fármacos <sup>35,36</sup>. Por lo tanto, el nivel de expresión de P-gp y su integridad funcional pueden influir en la farmacocinética de los fármacos que son sustratos de este transportador <sup>37</sup>.

## 2.4. Tipos de estudios farmacogenéticos

En la búsqueda de biomarcadores de respuesta a los fármacos se pueden seguir varias estrategias para encontrar aquellos polimorfismos vinculados a un determinado perfil de respuesta.

### 2.4.1. Estudios de genes candidatos

En un primer momento, la aproximación en investigación farmacogenética se basaba en el estudio de genes candidatos. Es decir, el análisis de polimorfismos en genes potencialmente implicados en la respuesta a los fármacos. Esta potencial relación entre el gen y el posible fenotipo o efecto concreto se establece en base al conocimiento previo sobre la función del gen. En el caso de la farmacogenética, los genes candidatos están generalmente relacionados con la farmacocinética y/o farmacodinamia de un determinado fármaco.

Este tipo de aproximación ha sido la más extendida durante las últimas décadas, posiblemente por requerir de menor inversión, y ha demostrado ser una estrategia eficaz en la identificación de polimorfismos asociados a efectos de los fármacos. Sin embargo, este tipo de estudios también presentan ciertas limitaciones, como la necesidad de disponer de conocimiento previo sobre el fármaco y los genes implicados en su metabolismo y mecanismo de acción, muchas veces insuficiente. Con todo, los estudios de genes candidatos requieren de un menor tamaño muestral para alcanzar el poder estadístico deseado, haciendo que estos análisis sean una herramienta coste-efectiva <sup>38</sup>.

### 2.4.2. Estudios de genoma completo (GWAS)

La mejora en las técnicas de secuenciación masiva (NGS, del inglés *next-generation sequencing*) ha permitido que conocer el genoma completo ya no sea un proceso excesivamente costoso. Gracias a esto se ha podido dar el salto del análisis de genes candidatos a los estudios de asociación de genoma completo, conocidos como GWAS (del inglés *Genome Wide Association Studies*). Esta poderosa metodología analiza en todo el genoma aquellos SNP relacionados con un fenotipo de respuesta a los fármacos, con la ventaja de no ser necesaria una hipótesis previa de asociación entre un gen y ese determinado efecto del fármaco. Por tanto, la principal ventaja que ofrecen este tipo de estudios es la posibilidad de descubrir genes y variantes relacionados con el efecto del fármaco que no habían sido previamente descritos, sin la necesidad de un conocimiento exhaustivo sobre la fisiología de la enfermedad o el efecto del fármaco. Además, analizando todo el genoma se evitan sesgos asociados a la formulación de hipótesis basadas en el conocimiento previo. Sin embargo, este tipo de aproximación, aunque cada vez más frecuente, no es accesible para todos los grupos de investigación, puesto que los costes son superiores al análisis mediante genes candidatos. Además, presenta ciertas limitaciones, el gran número de polimorfismos analizados en un GWAS requiere el uso de niveles estrictos de significación estadística para evitar falsos positivos, lo que lleva a la necesidad de un gran tamaño muestral, que generalmente es difícil de alcanzar ya que este tipo de estudios incluyen por definición tanto una enfermedad (pudiendo darse en baja prevalencia) como un fenotipo de respuesta al fármaco bien establecido, que limita aún más la población de estudio disponible <sup>38</sup>. Además, dado el manejo de grandes cantidades de datos, el análisis bioinformático de estas asociaciones es muy laborioso.

### 2.5. Hacia una medicina de precisión

Gracias al desarrollo de la biología molecular y a los conocimientos adquiridos con el Proyecto Genoma Humano, se espera que en un futuro no muy lejano la medicina



pueda ser individualizada, o como se le ha comenzado a denominar, “medicina de precisión”. El *National Research Council* de Estados Unidos publicó en 2011 la siguiente definición de medicina de precisión: *“Adaptación del tratamiento médico a las características individuales de cada paciente. No implica literalmente la generación de medicamentos o tecnologías médicas únicas para cada paciente, sino la capacidad de clasificar a los pacientes en subpoblaciones que difieren en su susceptibilidad a experimentar una determinada enfermedad, en la biología y/o el pronóstico de esta enfermedad, o en su respuesta a un determinado tratamiento. De esta forma, es posible aplicar intervenciones preventivas o terapéuticas en aquellos grupos de pacientes que tendrán un beneficio de las mismas, evitando el gasto innecesario y posibles efectos secundarios a aquellos que no lo obtendrán”*<sup>39</sup>.

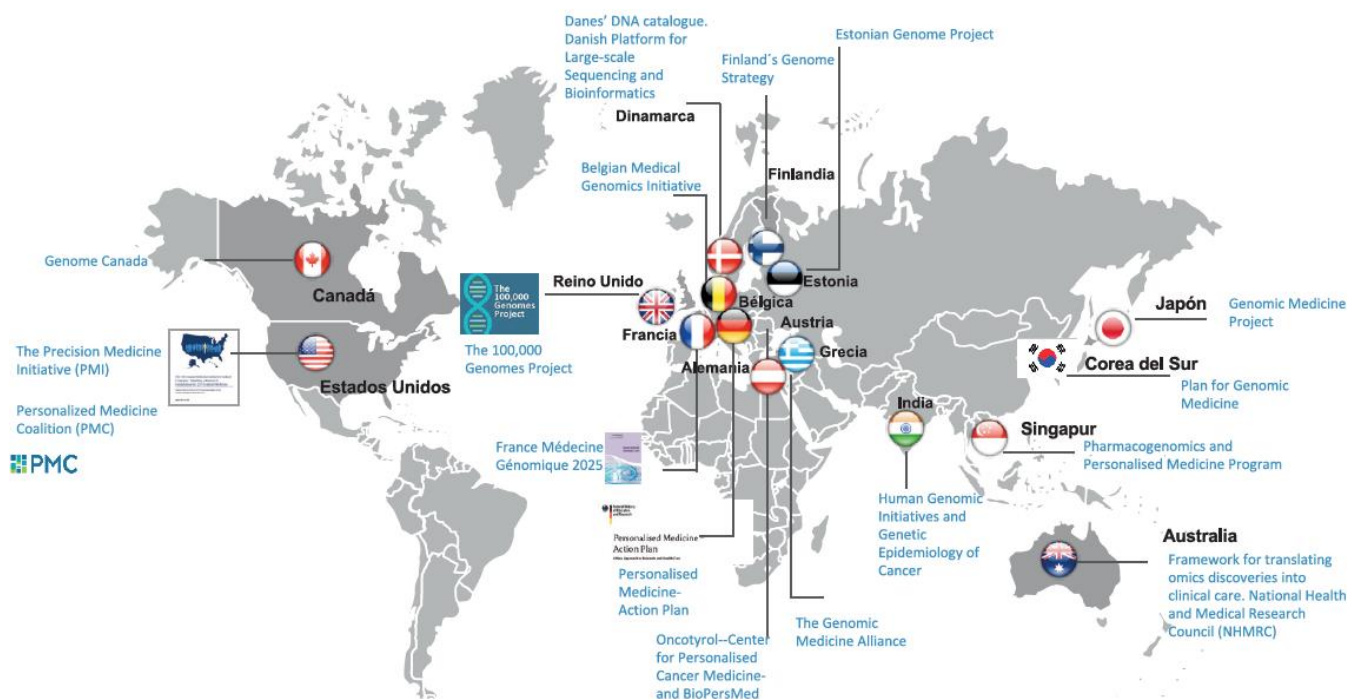
Así, la medicina de precisión reconoce que cada paciente es único de modo que, mediante pruebas diagnósticas específicas para algunas enfermedades, se puede predecir cómo va a responder un paciente al tratamiento, determinar la mejor dosis y la duración del tratamiento. Puesto que el principal objetivo de la farmacogenética es el desarrollo de la medicina de precisión, esta es un área de la investigación traslacional en crecimiento, que promete revolucionar el tratamiento de los pacientes mediante una medicina más predictiva (terapia dirigida), sustituyendo al clásico modelo de ensayo-error.

Este enfoque ya está siendo implantado en iniciativas de medicina personalizada, de precisión o medicina genómica en varios países (figura 7)<sup>40</sup>. Todas ellas tienen el objetivo de impulsar la investigación para generar nuevos conocimientos que permitan implementar avances en la práctica clínica habitual, mejorando los resultados en prevención, diagnóstico y tratamiento de los pacientes, para contribuir a garantizar la sostenibilidad de los sistemas sanitarios.

La individualización del tratamiento para reducir la variabilidad en la respuesta será uno de los principales objetivos de la práctica clínica en los próximos años<sup>10</sup>, por lo

## I. Introducción

que la farmacogenética tiene una aplicación clínica directa. Estos ejemplos de implantación de iniciativas de medicina personalizada y otros muchos ilustran como el escenario ha pasado a ser un rápido descubrimiento de datos farmacogenéticos, esperando por otra parte que estos sean implementados en la práctica clínica.



**Figura 7.** Planes y Estrategias en Medicina Personalizada, de Precisión o Medicina Genómica en varios países.

Fuente original: Propuesta de Recomendaciones para una Estrategia Estatal de Medicina Personalizada de Precisión. Fundación Instituto Roche <sup>39</sup>.

La farmacogenética ha demostrado su utilidad en los casos donde el paciente no alcanza la eficacia necesaria o aparecen efectos adversos graves. La prescripción guiada a través de la farmacogenética puede mejorar el resultado clínico rápida y satisfactoriamente. Por tanto, su uso puede ser extremadamente útil para el sistema sanitario porque contribuirá a individualizar la dosis o la elección de tratamiento. De hecho, llegará un día en el que se considerará no ético el no realizar test farmacogenéticos de rutina para evitar exponer a los pacientes a dosis o fármacos que pueden ser perjudiciales o no eficaces para ellos. La posibilidad de identificar a los individuos susceptibles tiene también importancia económica porque puede reducir

los ingresos por efectos adversos graves y los costes tanto directos como indirectos que eso conlleva. El genotipado presenta las ventajas de que solamente es necesario hacerlo una vez en la vida, a diferencia del fenotipado, y de que su coste es muy inferior al de un día de estancia hospitalaria. Por lo tanto, el genotipado presentará una relación coste-beneficio muy favorable si consigue reducir el número de ingresos o la duración de la hospitalización, al evitar los efectos adversos o alcanzar niveles terapéuticos de una forma más precoz. Además, debemos tener en cuenta que, a medida que avanza la tecnología, los resultados están disponibles con mayor rapidez y los costes del genotipado son cada vez menores.

### 2.5.1. Guías de práctica clínica

Para mantenerse al día de los principales hallazgos y comprender la información farmacogenética, y así facilitar la toma de decisiones, es fundamental contar con guías de práctica clínica que faciliten el acceso a toda esta información y proporcionen recomendaciones de tratamiento. Sin embargo, la rápida generación de conocimiento no siempre implica que la evidencia clínica sea suficiente para marcar unas directrices en cuanto al tratamiento o dosis a prescribir. Es por esto por lo que muchas veces los profesionales sanitarios se enfrentan a una falta de instrucciones a la hora de interpretar los datos existentes, o a datos inadecuados o insuficientes que les puedan guiar. En respuesta a esta necesidad, PharmGKB (*The Pharmacogenomics Knowledge Base*), una herramienta de acceso libre que ayuda a los investigadores a conocer cómo la variación genética entre individuos contribuye a generar diferentes respuestas a los fármacos, y la Red de Investigación Farmacogenómica (PGRN, *Pharmacogenomics Research Network*) se unieron para formar el Consorcio para la Implementación de la Farmacogenética en la Clínica (CPIC, *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*). El principal objetivo de este consorcio es abordar esta barrera para la implementación clínica de las pruebas farmacogenéticas mediante la creación, selección y publicación de guías detalladas de práctica clínica de pares fármaco/gen.

## I. Introducción

Hasta el momento, se han publicado 22 guías incluyendo 46 fármacos (ver tabla 3, <https://cpicpgx.org/guidelines/>) aunque varias más están en proceso de elaboración (<https://www.pharmgkb.org/guidelines>). Las guías ya elaboradas se refieren, entre otras, a las siguientes parejas gen/fármaco: *TPMT*/tiopurinas, *CYP2C19*/clopidogrel, *CYP2C9+VKORC1*/warfarina, *CYP2D6*/codeína, *HLA-B*/abacavir, *HLA-B*/alopurinol, *SLC01B1*/simvastatina y *CYP2D6-CYP2C19*/antidepresivos tricíclicos.

**Tabla 3.** Parejas fármaco-gen para las cuales existe guía de práctica clínica elaborada por el Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC).

Guías de recomendación	Fármacos	Genes
CFTR e ivacaftor	ivacaftor	CFTR
CYP2C19 y clopidogrel	clopidogrel	CYP2C19
CYP2C19 y voriconazol	voriconazol	CYP2C19
CYP2C9, HLA-B y fenitoína	fenitoína	HLA-B CYP2C9
CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 y warfarina	warfarina	CYP4F2 VKORC1 CYP2C9
CYP2D6 y atomoxetina	atomoxetina	CYP2D6
CYP2D6 y codeína	codeína	CYP2D6
CYP2D6 y ondansetrón y tropisetron	ondansetrón tropisetron	CYP2D6
CYP2D6 y tamoxifeno	tamoxifeno	CYP2D6
CYP2D6, CYP2C19 e inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina	citalopram escitalopram fluvoxamina paroxetina sertralina	CYP2C19 CYP2D6
CYP2D6, CYP2C19 y antidepresivos tricíclicos	amitriptilina clomipramina desipramina doxepina imipramina nortriptylina trimipramina	CYP2C19 CYP2D6
CYP3A5 y tacrolimus	tacrolimus	CYP3A5
DPYD y fluoropirimidinas	capecitabina fluorouracilo tegafur	DPYD
G6PD y rasburicasa	rasburicasa	G6PD
HLA-A, HLA-B y carbamazepina y oxcarbazepina	carbamazepina oxcarbazepina	HLA-A HLA-B
HLA-B y abacavir	abacavir	HLA-B
HLA-B y alopurinol	alopurinol	HLA-B

Guías de recomendación	Fármacos	Genes
IFNL3 y regímenes basados en interferón pegilado	interferón pegilado alfa-2a interferón pegilado alfa-2b ribavirina	IFNL3
RYR1, CACNA1S y agentes anestésicos volátiles y succinilcolina	desflurano enflurano halothano methoxyflurano isoflurano sevoflurano succinilcolina	RYR1 CACNA1S
SLCO1B1 y simvastatina	simvastatina	SLCO1B1
TPMT, NUDT15 y tiopurinas	azatioprina mercaptopurina tioguanina	NUDT15 TPMT
UGT1A1 y atazanavir	atazanavir	UGT1A1

Nótese que cada guía de recomendación está marcada con un hipervínculo que redirige a su resumen en la página del CPIC.

### 2.5.2. Implementación de la farmacogenética en la práctica clínica

Tal y como se viene comentando en los apartados anteriores, la variabilidad interindividual en el tratamiento farmacológico es uno de los retos que afronta la medicina. Sin embargo, a pesar de la utilidad demostrada de la información farmacogenética, esta no siempre se aplica en la práctica clínica habitual, siendo su implementación una barrera que dificulta alcanzar la medicina de precisión. Para lograr esa implementación, se pueden seguir dos estrategias:

#### ❖ Genotipado caso a caso o “*ad hoc*”:

Consiste en la determinación de aquellas variantes necesarias para manejar el tratamiento que requiere el paciente en ese determinado momento. Un ejemplo de este modelo es el ajuste de dosis que se realiza en los pacientes portadores de las variantes alélicas *TPMT*\*2, \*3B o \*3C. El descenso en la actividad enzimática que originan estos alelos causa una elevada toxicidad hematopoyética cuando se prescribe tratamiento con tioguaninas; por tanto, la dosis se reduce a la mitad si el paciente es portador en heterocigosis de uno de los alelos. En el caso de que un paciente sea portador en homocigosis, la dosis se reducirá al 10% de la dosis habitual. Aunque esta

estrategia tiene la ventaja de generar una información que será útil y aplicable directamente en el tratamiento de elección, tiene la desventaja de suponer un mayor coste y un retraso en la entrega de resultados. Por tanto, esta estrategia se ve abocada a ser minoritaria conforme avancen las plataformas de genotipado, haciendo que múltiples determinaciones tengan un menor coste.

### ❖ Genotipado anticipado:

Se trata de la obtención de la información genética “*at initio*”, es decir, cuando el paciente contacta con el sistema sanitario, de manera que esté disponible antes de la decisión de prescripción. Esta estrategia, a su vez, puede ser dividida en dos enfoques, el primero de ellos el implementado en Norteamérica <sup>41</sup> en el que todos los pacientes son genotipados para las principales variantes, independientemente de la patología. Este enfoque es muy ventajoso, pero claramente inaccesible para todos los sistemas de salud. El segundo enfoque centra el genotipado anticipado en poblaciones de riesgo susceptibles de recibir un tratamiento diana <sup>42</sup>. Un ejemplo sería el genotipado de todos los pacientes que van a ser sometidos a un trasplante de progenitores hematopoyéticos para así poder guiar el tratamiento con voriconazol, fármaco con guía de práctica clínica del CPIC, y que es muy probable que vaya a necesitar un paciente de estas características. El avance de la tecnología permite el desarrollo de *arrays* de genotipado capaces de determinar gran cantidad de variantes en múltiples farmacogenes, a un coste relativamente bajo, de modo que la información esté disponible antes de cualquier decisión de prescripción. El proyecto eMERGE-PGx, desarrollado por un grupo estadounidense, trata de integrar toda esta información en la historia clínica electrónica de los pacientes, para demostrar la utilidad del genotipado anticipado en la práctica clínica <sup>43</sup>.

En este momento, la estrategia caso a caso es la mayoritariamente adoptada en la práctica clínica en nuestro país. No obstante, la situación está cambiando conforme se introducen técnicas con un coste cada vez menor y que se aproxima al coste del

genotipado dirigido, con la ventaja de aportar una mayor información relevante, actual y futura, para el paciente. A pesar de ser múltiples los factores que tienen un papel en los enfoques farmacológicos, los casos con evidencia clínica probada deben ser implementados en la clínica, en beneficio de los pacientes. Aunque la medicina de precisión requiere enfoques mucho más amplios, los esfuerzos para generar información farmacogenética útil son muy prometedores. Sin embargo, la aplicación de las pruebas farmacogenéticas en la práctica clínica sigue siendo limitada, por presentar retos significativos, como las dificultades de los clínicos para interpretar los resultados de las pruebas farmacogenéticas, la necesidad de acortar los tiempos de respuesta o la falta de infraestructuras que faciliten el genotipado de múltiples variantes en un breve periodo de tiempo.

La inclusión de la farmacogenética en la práctica clínica pasa por la identificación de poblaciones de pacientes susceptibles de recibir un determinado fármaco, y el desarrollo de métodos prácticos, económicos, rápidos y precisos para la determinación de la composición genética de los individuos.

### 3. NEUROINTERVENCIONISMO PERCUTÁNEO

El término neurointervencionismo agrupa el conjunto de actividades diagnósticas y terapéuticas que se han desarrollado en el ámbito de la neurorradiología y que se aplican en determinadas enfermedades que afectan al SNC. Dentro del neurointervencionismo destacan las técnicas endovasculares, siendo ampliamente reconocido su papel en el diagnóstico y tratamiento de la patología vascular del SNC <sup>44-46</sup>. El progreso de estos procedimientos endovasculares en los últimos 30 años, ha situado al neurointervencionismo como la alternativa de primera elección para el tratamiento de muchas patologías vasculares que afectan al SNC <sup>47</sup>. La mayor parte de los procedimientos realizados en neurorradiología intervencionista se efectúan con microcatéteres introducidos desde la ingle, tras puncionar la arteria femoral, hasta acceder a los vasos del cerebro, cuello y médula. Además, se trata de técnicas

percutáneas realizadas por punción directa de la piel <sup>48</sup>. Entre las patologías más comunes tratadas mediante neurointervención se encuentran el aneurisma cerebral, el infarto cerebral y la estenosis carotídea.

### 3.1. Aneurismas cerebrales

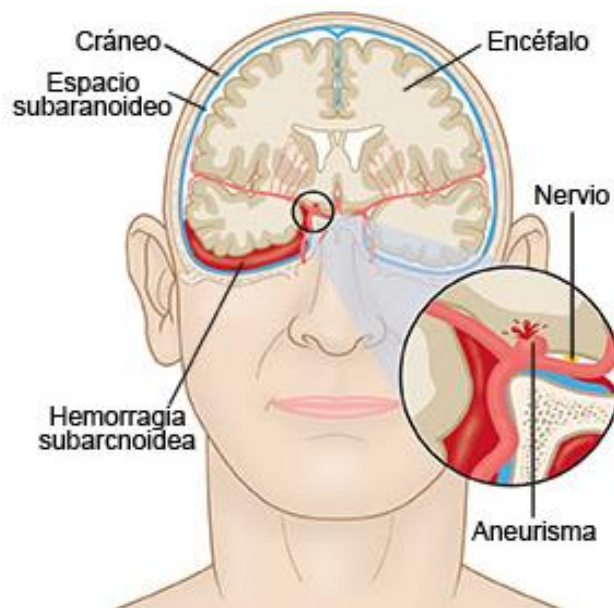
Un aneurisma es una protuberancia o dilatación anormal que aparece en la pared de una arteria. Cuando el aneurisma se da en arterias cerebrales, se puede producir su rotura dando lugar a un accidente cerebrovascular hemorrágico, pudiendo provocar un cuadro de extrema gravedad, déficits neurológicos o incluso la muerte.

Los aneurismas cerebrales afectan mayoritariamente a las mujeres, suelen producirse entre los 35 y 70 años y se estima que afectan a un 2% de la población general. Además, en un 20% de los casos se forma más de un aneurisma cerebral <sup>48</sup>. El 85% de estas lesiones se localizan en la parte anterior de la circulación cerebral, el restante se da en regiones posteriores, al lado del tronco encefálico y el cerebelo <sup>48</sup>.

El riesgo de rotura de un aneurisma es del 0,2-3% anual, dependiendo de su forma, tamaño, localización y los antecedentes de sangrado por la misma causa <sup>48</sup>. Cuando se rompe el aneurisma, la sangre pasa al espacio subaracnoideo que rodea al cerebro (figura 8), produciéndose una hemorragia subaracnoidea (HSA), asociada a una elevada mortalidad (alrededor del 30%) y morbilidad (alrededor del 50% de los pacientes que sobreviven tendrán algún tipo de secuela). Este sangrado inicial, independientemente del tratamiento del aneurisma, puede ocasionar complicaciones como la dilatación de los ventrículos cerebrales o la aparición de vasoespasmo (estrechamiento de los vasos sanguíneos cerebrales, disminuyendo el riego dentro del cerebro).

Todos los aneurismas cerebrales con rotura deben ser tratados con el objetivo de evitar que el aneurisma vuelva a romperse, puesto que el 30% de los pacientes vuelven a sangrar en el siguiente mes tras la hemorragia inicial <sup>48</sup>.

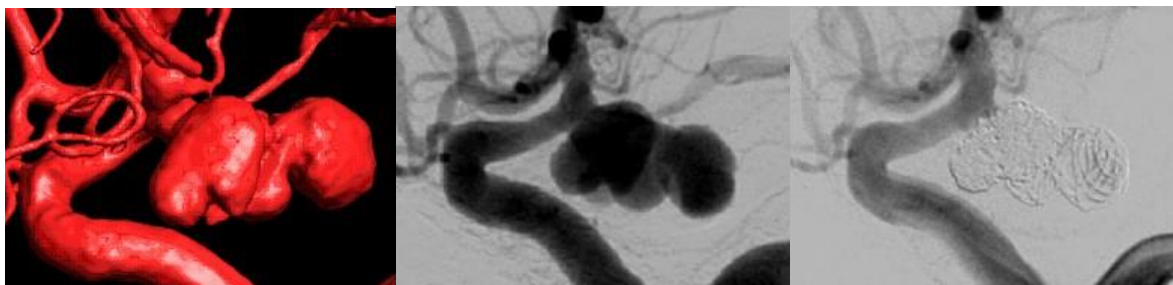




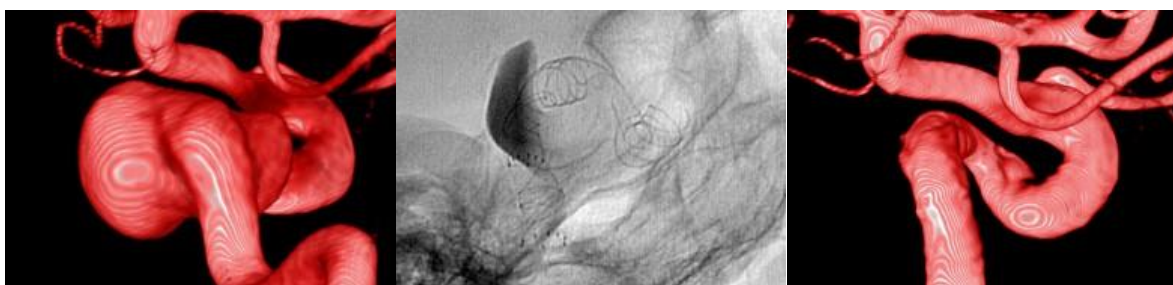
**Figura 8.** Hemorragia subaracnoidea secundaria a la rotura de un aneurisma.

El tratamiento endovascular o “embolización” es un tratamiento mínimamente invasivo para cerrar los aneurismas sin necesidad de cirugía abierta. Esta intervención se da bien cuando ya ha habido una hemorragia cerebral producida por la rotura de un aneurisma o bien cuando el aneurisma aún no se ha roto pero se ha detectado en pruebas radiológicas. El clínico neurointervencionista introduce un catéter muy fino y flexible en una arteria femoral, y lo conduce, guiado por rayos X, por dentro de los vasos sanguíneos del cuello y la cabeza, hasta que alcanza la arteria cerebral con el aneurisma. Un microcatéter se sitúa en el cuello del aneurisma y por su interior se introducen unas pequeñas espirales metálicas (o *coils*, en inglés) que ocupan al máximo posible el interior del aneurisma, obstruyéndolo y evitando así que entre sangre en su interior, para eliminar el riesgo de rotura y sangrado (figura 9a). En ocasiones puede ser necesario combinar estos materiales con otros dispositivos como muelles (o *stents* en inglés), que se expanden en la arteria para tapar el cuello del aneurisma. Algunos stents muy tupidos (derivadores de flujo) pueden cerrar el aneurisma sin la necesidad de introducir coils (figura 9b).

a) Embolización con *coils*



b) Embolización con *stent*



**Figura 9.** Procesos de embolización de un aneurisma mediante la colocación de (a) coils o (b) stent.

Imágenes obtenidas de <http://www.neurovascularmadrid.com>.

### 3.2. Infarto cerebral

El infarto cerebral, o ictus, se da por la ausencia o disminución de circulación sanguínea en las arterias que irrigan el cerebro, provocando la muerte neuronal. Este flujo sanguíneo se interrumpe bien por la formación de un trombo en el corazón (por ejemplo, en los pacientes con fibrilación auricular), que se suelta y va al cerebro (embolia), ocluyendo un vaso cerebral, o por la rotura de una placa arteriosclerótica presente en las arterias carótidas o vertebrales, que da lugar a la formación de un trombo *in situ*. Esto produce una pérdida temporal o permanente de las funciones del hemisferio contrario al lado cerebral afectado.

En España se producen anualmente 120.000 nuevos casos de ictus, representando la tercera causa de muerte en nuestro país y la primera causa de discapacidad <sup>48</sup>. En ocasiones, se dan síntomas que pueden desaparecer en menos de 24h, en lo que se conoce como accidente isquémico transitorio (AIT), que no deja secuelas. Estos

síntomas incluyen pérdida de fuerza en la mitad del cuerpo, acorchamiento en la cara, extremidades, dificultad para articular palabras, pérdida de visión, sensación de vértigo, etc.<sup>48</sup>

El tratamiento de elección para el ictus dependerá de múltiples factores: la presencia o no de hemorragia cerebral, el tiempo que pasa hasta que el paciente acude al centro hospitalario, ictus relacionados con estenosis de arterias carótidas o vertebrales, trombos procedentes del corazón, etc. El trombo puede ser extraído, pero no se colocará ningún dispositivo, salvo si hay una estenosis que lo requiera, como se describe a continuación.

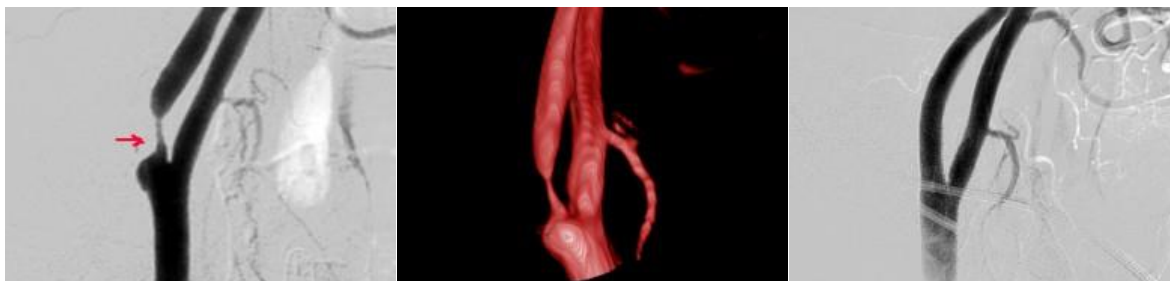
### 3.3. Estenosis carotídea

La arteriosclerosis es el proceso de endurecimiento de las arterias. Cuando esto se da en las arterias carótidas o vertebrales puede desembocar en falta de riego sanguíneo en el cerebro, por la obstrucción o estrechamiento del calibre de la arteria. Este estrechamiento puede reducir el caudal de sangre que llega al cerebro o enlentecer el flujo de la sangre a su paso por la zona estrechada, dando lugar a la formación de pequeños trombos o coágulos que, solos o junto a la placa de ateroma, pueden obstruir las pequeñas arterias cerebrales.

Cuando el grado de estrechamiento de las arterias es grande, además de tratamiento farmacológico para controlar los factores de riesgo como diabetes, hipertensión arterial o colesterol, se debe realizar un tratamiento directo sobre la propia arteria. Este consistirá en una cirugía para retirar la placa de ateroma (endarterectomía) o mediante un procedimiento neurointervencionista mínimamente invasivo (angioplastia).

La angioplastia consiste en la introducción de un pequeño catéter en la arteria femoral para llegar hasta los vasos sanguíneos del cuello. Allí se dilatará el estrechamiento de la arteria con unos catéteres con balón para después colocar un stent, una malla

metálica que se despliega dentro de la arteria para mantener abierto el vaso sanguíneo (figura 10). La incidencia de complicaciones de la angioplastia con stent es menor en comparación con la cirugía convencional en pacientes de alto riesgo <sup>48</sup>.



**Figura 10.** Angioplastia e implantación de stent en arteria carótida.

Imágenes obtenidas de <http://www.neurovascularmadrid.com>. La flecha muestra una estenosis severa (80% de la luz) en la arteria carótida izquierda. Después de la angioplastia y colocación de stent la carótida recupera su calibre normal.

Durante las prácticas de neurointervencionismo vascular se requiere el uso de doble terapia antiagregante (ácido acetilsalícilico y clopidogrel) para minimizar el riesgo de complicaciones tromboembólicas. Puesto que el clopidogrel es uno de los agentes más usados en el manejo perioperatorio de pacientes sometidos a procesos de neurointervencionismo, conocer su mecanismo de acción y los factores que determinan su activación y metabolismo es de gran importancia para asegurar la correcta antiagregación de esos pacientes.

## 4. TRATAMIENTO ANTIAGREGANTE

El papel que las plaquetas desempeñan en la trombosis arterial es un hecho bien establecido, lo que ha favorecido el desarrollo de múltiples fármacos con el objetivo de inhibir las funciones plaquetarias <sup>49</sup>. El tratamiento de enfermedades cardiovasculares y, en particular, la cardiopatía isquémica ha sufrido una notable transformación gracias al uso de terapia antiplaquetaria y al avance en la comprensión de los mecanismos moleculares que la subyacen <sup>50</sup>.

#### 4.1. Ácido acetilsalicílico

El uso del fármaco más conocido del mundo, el ácido acetilsalicílico, se remonta a hace más de 3500 años. La salicilina, un glucósido obtenido de la corteza de los sauces, pertenecientes a la familia de las salicáceas, es probablemente el remedio más antiguo en uso en la actualidad <sup>51</sup>. Pero no fue hasta 1763 cuando Edward Stone (1702–1768), un clérigo inglés, comenzó a realizar un estudio en 50 pacientes con fiebre, demostrando su efecto antipirético. En 1853, el químico francés Charles Gerhardt demostró por primera vez la reacción del salicilato de sodio con cloruro de acetilo, obteniendo sin saberlo ácido acetilsalicílico. Sin embargo, era un compuesto inestable e impuro <sup>52</sup>. En 1859 Hermann Kolbe descubre la estructura química y sintetiza ácido salicílico, con algunos inconvenientes como su excesivo sabor amargo e irritación estomacal <sup>51</sup>. Es en 1897 cuando la farmacéutica Bayer le encarga a Felix Hoffman la síntesis de un derivado de los salicilatos que no causara esos efectos secundarios, quien, bajo la dirección de Arthur Eichengrün, sintetizó ácido acetilsalicílico en su forma pura y estable, registrando Bayer el compuesto en 1899 bajo el nombre de aspirina <sup>51</sup>.

Siendo originariamente usado como antipirético y antiinflamatorio, el ácido acetilsalicílico se ha convertido por sus propiedades antiplaquetarias en la piedra angular para la prevención de eventos cardiovasculares y cerebrovasculares.

##### 4.1.1. Mecanismo de acción

El tromboxano A<sub>2</sub>, un derivado de ácido araquidónico, se sintetiza dentro de las plaquetas activadas, liberándose para funcionar como un agonista del receptor superficial de las plaquetas. Este *feedback* positivo que se genera produce la amplificación regional de la activación plaquetaria, estimulando así la vasoconstricción <sup>53</sup>. La síntesis de tromboxano A<sub>2</sub> está mediada por la enzima ciclooxigenasa 1 (COX-1). El ácido acetilsalicílico bloquea la actividad de COX-1 transfiriendo un grupo acetilo en un residuo de serina cercano al sitio de activación de la enzima. Esta acetilación es

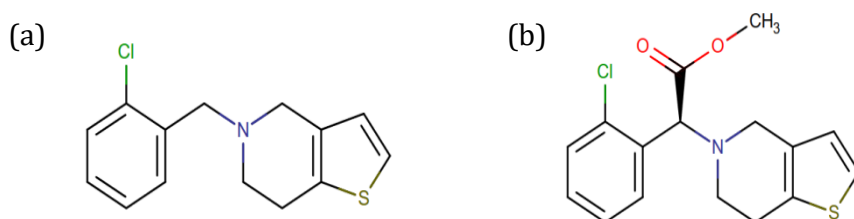
irreversible e impide la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub>, inhibición que persiste toda la vida de la plaqueta (7-10 días) <sup>54</sup>. Aunque el efecto inhibitorio del ácido acetilsalicílico sobre la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub> disminuye la funcionalidad plaquetaria, es importante tener en cuenta que el tromboxano A<sub>2</sub> es sólo uno de los muchos agonistas del receptor plaquetario (como trombina, colágeno, catecolaminas y adenosín difosfato, ADP) que pueden activar a las plaquetas. En definitiva, incluso aunque el tratamiento con ácido acetilsalicílico alcanzara el rango terapéutico óptimo, las plaquetas conservan la capacidad de activarse y formar un trombo. Es decir, la inactivación plaquetaria debida al ácido acetilsalicílico es parcial <sup>53</sup>.

### 4.2. Tienopiridinas: ticlopidina y clopidogrel

La ticlopidina fue descubierta en 1972 y desarrollada como un agente antitrombótico, para su comercialización en 1978. Este fármaco demostró beneficio clínico en pacientes con accidente isquémico transitorio, déficit neurológico isquémico reversible o accidente cerebrovascular menor <sup>55</sup>, en pacientes con antecedentes recientes de eventos cerebrales isquémicos relacionados con aterosclerosis <sup>56</sup> y en pacientes con enfermedad vascular periférica <sup>57</sup>. En esta población de alto riesgo, la ticlopidina redujo la morbilidad y la mortalidad cardiovascular en un 60% <sup>50</sup>.

El clopidogrel, descubierto en 1986 y comercializado en 1997, demostró prevenir la muerte cardiovascular en pacientes arterioscleróticos en el ensayo clínico CAPRIE, que incluyó más de 19.000 pacientes <sup>58</sup>. En este estudio, donde se comparaba la eficacia de clopidogrel frente a ácido acetilsalicílico en pacientes con riesgo de eventos isquémicos, se vio que clopidogrel era más eficaz en reducir el riesgo de infarto isquémico, infarto de miocardio y muerte vascular, sugiriendo así su uso extendido para la prevención de eventos isquémicos. A su vez, se demostró que el perfil de seguridad de clopidogrel era, al menos, tan bueno como una dosis media de ácido acetilsalicílico.

La ticlopidina y el clopidogrel pertenecen ambos a la familia de la tienopiridinas presentando sólo diferencias estructurales mínimas (ver figura 11). Sin embargo, la presencia de un grupo metoxycarbonilo en la posición bencílica en la molécula de clopidogrel le proporciona una mayor actividad farmacológica y un mejor perfil de seguridad <sup>50</sup>. El clopidogrel es un enantiómero S, y, testado en animales, se ha comprobado que el enantiómero R (SR25989) carece de actividad antitrombótica, lo que indica que la posición es crucial para la actividad farmacológica de clopidogrel.



**Figura 11.** Estructura química de (a) ticlopidina y (b) clopidogrel.

En varios modelos de trombosis arterial, el clopidogrel ha demostrado una potente actividad antitrombótica dosis-dependiente, siendo aproximadamente 50 veces más potente que la ticlopidina y 100 veces más activo que el ácido acetilsalicílico <sup>59</sup>. Además, después de la comercialización de clopidogrel, el uso de ticlopidina disminuyó significativamente ya que se asoció con neutropenia en aproximadamente el 2% de los pacientes <sup>60</sup>.

El tratamiento combinado de ácido acetilsalicílico con tienopiridinas, como el clopidogrel, ha sido la piedra angular del tratamiento antiagregante para la prevención de complicaciones recurrentes en pacientes con síndrome coronario agudo durante y después de intervenciones coronarias percutáneas con implantación de stent <sup>61,62</sup>. En el caso de neurointervenciones, se prescribe de igual forma junto a ácido acetilsalicílico para prevenir eventos aterotrombóticos y tromboembólicos en pacientes con implantaciones de stent en arterias carótidas, vertebrales o craneales.

### 4.3. Clopidogrel

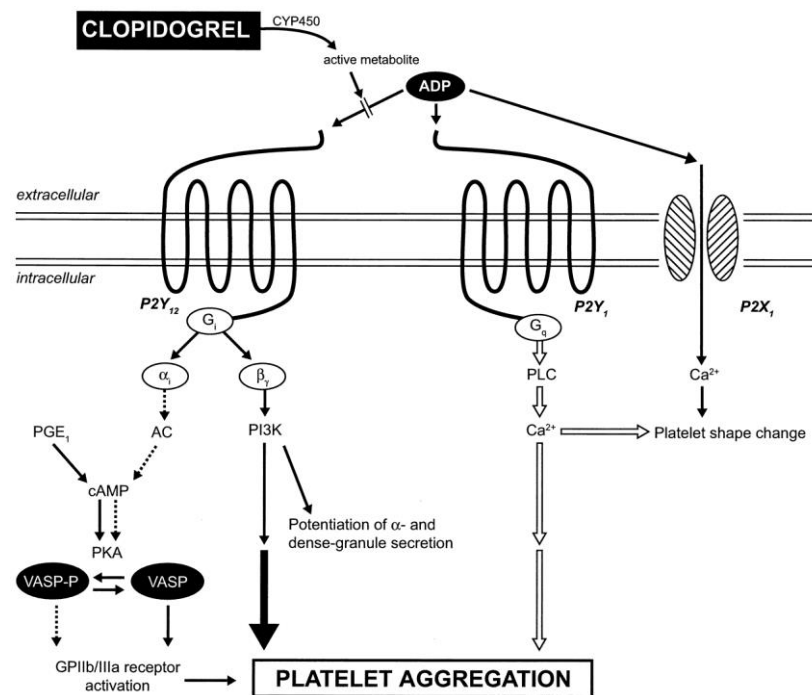
#### 4.3.1. Mecanismo de acción

El ADP es un cofactor fundamental para la agregación plaquetaria y actúa uniéndose a receptores específicos de la superficie de las plaquetas, acoplados a proteína G: los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub>. La estimulación de las plaquetas mediada por ADP conduce a un cambio en su forma y agregación. Para una correcta agregación plaquetaria inducida por ADP, es necesaria la coactivación de los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub> de las plaquetas <sup>63</sup>.

El clopidogrel es un profármaco, es decir, no tiene efecto antiagregante por sí mismo, sino que ejerce su efecto terapéutico una vez metabolizado a través del CYP450. El metabolito activo tiol de clopidogrel (R130964) se une específica e irreversiblemente al receptor purinérgico P2Y<sub>12</sub> de las plaquetas, inhibiendo la activación y agregación plaquetarias mediada por ADP <sup>64</sup>. Aunque no se produce una interferencia directa con el receptor GPIIb-IIIa, como este complejo es el principal receptor de fibrinógeno, su activación alterada impide que el fibrinógeno se una a las plaquetas, de forma que se inhibe la agregación plaquetaria (figura 12). Como se une de forma irreversible, las plaquetas se ven afectadas durante toda su vida de aproximadamente 7-10 días.

La actividad antiagregante puede observarse a las dos horas después de la administración, tanto oral como intravenosa, de una dosis de clopidogrel <sup>59</sup>. Tras la administración de dosis múltiples de clopidogrel 75 mg/día se alcanza el estado estacionario entre el día 3 y 7. Una vez alcanzado, el nivel medio de inhibición plaquetaria está entre el 40 y el 60% <sup>65</sup>. En general, tras la suspensión del tratamiento, la agregación plaquetaria y el tiempo de sangrado vuelven gradualmente a los valores basales en los 5 días posteriores <sup>65</sup>.





**Figura 12.** Mecanismo de acción de clopidogrel.

Tomada de Nguyen TA, *et al.*, 2005 <sup>66</sup>.

#### 4.3.2. Propiedades farmacocinéticas

Aproximadamente el 50% del profármaco se absorbe, pero el 85% de este es hidrolizado por las esterasas a formas inactivas, mientras que el 15% restante estará disponible para su transformación en el metabolito activo <sup>67</sup>.

En voluntarios sanos, el tiempo hasta alcanzar la concentración máxima ( $T_{max}$ ) de metabolito activo es independiente de la dosis de clopidogrel, siendo alrededor de 0,5-1 h. Por el contrario, el área bajo la curva concentración tiempo (AUC, del inglés *area under the curve*) y la concentración máxima ( $C_{max}$ ) del metabolito activo dependen de la dosis del fármaco original y siguen una cinética no-lineal. La  $C_{max}$  es de 84 ng/mL y 32 ng/mL, con dosis de carga de 300-600 mg o dosis de mantenimiento de 75 mg.

Tanto el clopidogrel como su metabolito activo se unen con alta afinidad a proteínas plasmáticas (98% y 94%, respectivamente) <sup>68-70</sup>. Después de una dosis oral única de 75 mg, el clopidogrel tiene una vida media ( $T_{1/2}$ ) de aproximadamente 6 horas, pero

## I. Introducción

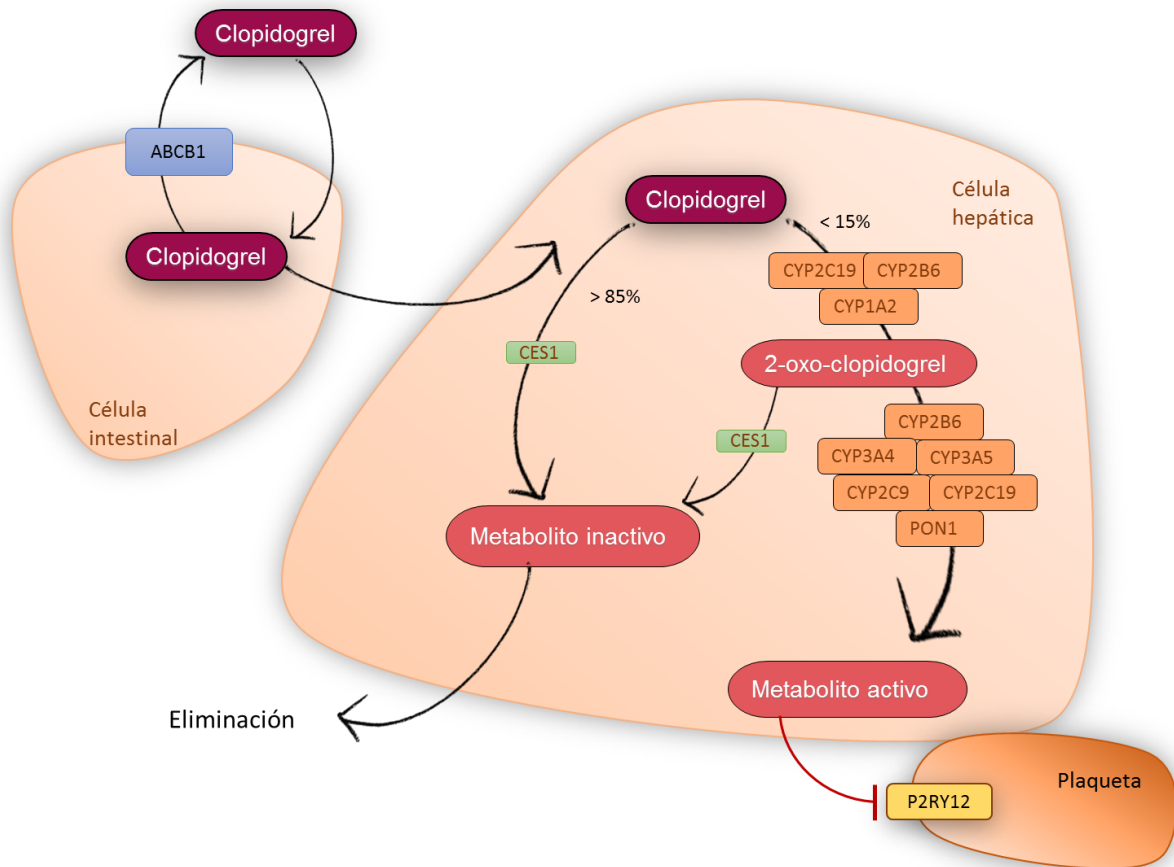
como el efecto del metabolito activo sobre el receptor  $P2Y_{12}$  es irreversible, este valor no refleja la duración de la inhibición de la agregación plaquetaria (3-10 días) <sup>68</sup>. La  $T_{1/2}$  del principal metabolito circulante (inactivo) es de 8 h tras la administración de dosis únicas y repetidas <sup>65</sup>. Tras una dosis oral de clopidogrel, alrededor del 50% se excreta por orina y aproximadamente el 46% por vía fecal en las 120 h siguientes a la administración <sup>65</sup>.

El ratio de absorción gastrointestinal de clopidogrel puede variar entre los individuos, afectando por tanto al comienzo de la respuesta <sup>71,72</sup>. Los niveles de expresión de la P-gp, codificada por *ABCB1*, un transportador dependiente de ATP localizado en la pared de la célula epitelial intestinal que expulsa el fármaco a la luz intestinal, podría afectar a su permeabilidad y, por tanto, alterar la biodisponibilidad oral de clopidogrel <sup>68,71</sup>.

### 4.3.3. Metabolismo

La figura 13 refleja que son numerosas las enzimas implicadas en el metabolismo de clopidogrel, y, por tanto, muchos factores podrían determinar la variabilidad en la respuesta al mismo.

Como se ya se ha mencionado previamente, clopidogrel requiere de su activación en el hígado para ejercer su efecto farmacológico. Aproximadamente el 85% del fármaco es metabolizado por la carboxilesterasa 1 (CES1) a su forma inactiva (ácido carboxílico)<sup>73</sup>. Por otro lado, ocurren dos procesos oxidativos consecutivos a cargo de numerosas enzimas CYP, que transforman el 15% restante en metabolito activo. Primero, las isoformas CYP2C19, CYP2B6 y CYP1A2 convierten el clopidogrel en 2-oxo-clopidogrel. Después, las isoformas CYP3A4, CYP3A5, CYP2B6, CYP2C9 y CYP2C19 transforman el 2-oxo-clopidogrel en su metabolito activo <sup>74</sup>. Además, la enzima paraoxonasa-1 (PON1) también participa en el segundo paso, convirtiendo 2-oxo-clopidogrel en su metabolito activo <sup>75</sup>. El 50% del 2-oxo-clopidogrel es metabolizado por CES1 a un compuesto inactivo, limitando la cantidad de metabolito activo que se forma <sup>76</sup>.



**Figura 13.** Ilustración de la vía metabólica del clopidogrel.

#### 4.4. Farmacogenética del clopidogrel

El efecto de clopidogrel varía ampliamente entre los pacientes, de tal forma que entre un 5 y un 56% de pacientes son malos respondedores o no respondedores al mismo <sup>77</sup> y, por tanto, tendrán un mayor riesgo de eventos isquémicos después de la implantación de un stent <sup>78-80</sup>. Esta variabilidad en la respuesta puede estar causada en parte por los polimorfismos en genes relacionados con su farmacocinética y su mecanismo de acción. En las siguientes páginas se presenta el efecto de las variantes en dichos genes sobre la respuesta a clopidogrel.

##### CYP2C19

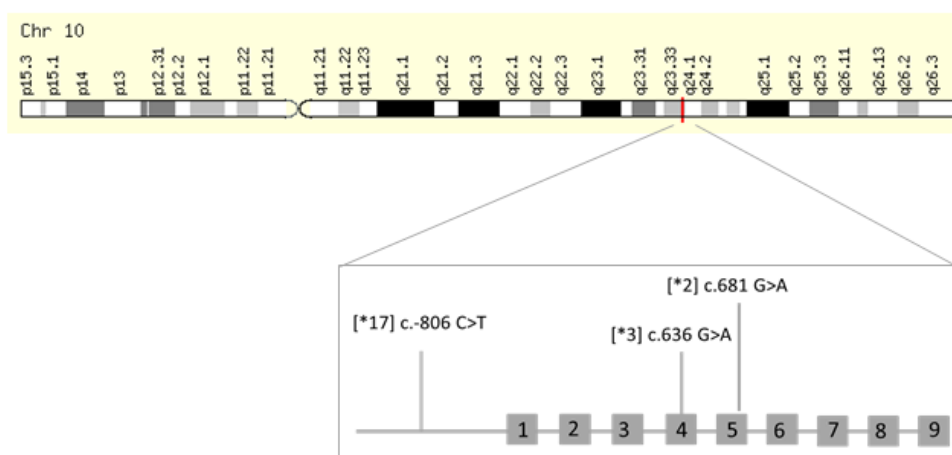
Puesto que la isoforma CYP2C19 está involucrada en los dos pasos necesarios para formar el metabolito activo, y contribuye a una formación estimada del 45% del 2-oxo-clopidogrel y del 21% del metabolito activo <sup>81</sup>, los polimorfismos genéticos presentes

## I. Introducción

en la misma podrían alterar la respuesta al tratamiento con clopidogrel. Por tanto, ha sido la enzima del metabolismo de clopidogrel que más se ha estudiado hasta la fecha.

El gen *CYP2C19* se encuentra localizado en el cromosoma 10 (banda citogenética 10q23.33; chr10:94.762.624-94.853.260 GRCh38/hg38) y contiene 90.637 bases, en el que encontramos 9 exones y largas regiones intrónicas (figura 14).

Se trata de un gen muy polimórfico, identificándose hasta la fecha 46 alelos registrados en la plataforma PharmVar (*The Pharmacogene Variation Consortium*, <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2C19>)<sup>82</sup>.



**Figura 14.** Contexto genético del gen *CYP2C19* y los polimorfismos estudiados.

El hecho de que este gen sea tan polimórfico, va a condicionar que la expresión de la proteína que genera sea variable en la población, lo que puede explicar la variabilidad interindividual en la respuesta a los fármacos metabolizados por la enzima *CYP2C19*.

Los polimorfismos más frecuentes (con una frecuencia superior al 5%) son los que se han estudiado en más profundidad (figura 14). Entre ellos se encuentran los alelos *CYP2C19* \*2, \*3 y \*17<sup>83</sup>. Entre las variantes que codifican enzimas de actividad reducida o ausente, el *CYP2C19*\*2 (rs4244285, 681G>A) es el alelo de pérdida de función más común en población caucásica, con una frecuencia del 15%<sup>84</sup>. Este SNP provoca un *splicing* aberrante que resulta en una alteración en el marco de lectura y

genera una proteína no funcional <sup>85</sup>. El alelo *CYP2C19*\*3 (rs4986893, 636G>A) es menos prevalente en nuestra población ya que presenta frecuencias inferiores al 1% en caucásicos, aunque se da en el 9% de los asiáticos <sup>84</sup>. Este SNP produce un codón de parada prematuro, traducándose por tanto en una proteína no funcional <sup>85</sup>.

Aunque existen otras variantes de pérdida de función, estas son menos prevalentes en las distintas poblaciones y representan un papel minoritario de los alelos de pérdida de función (tabla 4) <sup>84</sup>.

En cambio, el alelo *CYP2C19*\*17 (rs12248560, -806C>T) se asocia con un incremento de la actividad enzimática y está presente en aproximadamente el 21% de la población caucásica (tabla 4) <sup>84</sup>. Este SNP, que se da en el extremo 5' del gen, facilita la unión de proteínas nucleares y en consecuencia aumenta la transcripción de *CYP2C19* <sup>86</sup>.

**Tabla 4.** Frecuencias de los alelos de *CYP2C19* en los principales grupos étnicos.

Alelo	África	América	Asia	Europa	Este Medio	Oceanía	Sur/Centro Asia
*1 <sup>1</sup>	0,68	0,69	0,60	0,63	0,87	0,24	0,62
*2	0,15	0,12	0,29	0,15	0,12	0,61	0,35
*3	0,0052	0,00028	0,089	0,0042	0,011	0,15	0,024
*4	0,00093	0,0024	0,00049	0,0025	ND	ND	0,00
*5	ND	0,00	0,00062	0,000073	ND	ND	0,00
*6	0,00	0,00	0,00	0,00017	ND	ND	0,00
*7	ND	ND	ND	0,00	ND	ND	ND
*8	0,00	0,0012	0,00	0,0035	ND	ND	ND
*17	0,16	0,18	0,027	0,21	ND	ND	ND

ND: no determinado. Información obtenida de Scott SA *et al.*, 2013 <sup>84</sup>. <sup>1</sup> El alelo *CYP2C19*\*1, al no ser genotipado directamente, su frecuencia se calcula como: 1- (suma de las frecuencias del resto de alelos).

En base al genotipo del *CYP2C19*, los individuos son categorizados en diferentes fenotipos <sup>87</sup>:

- ❖ Metabolizadores lentos (PM, del inglés *poor metabolizers*): sujetos portadores de dos alelos de pérdida de función. Por ejemplo, sujetos con genotipo *CYP2C19* \*2/\*2, \*2/\*3 o \*3/\*3.

## I. Introducción

- ❖ Metabolizadores intermedios (IM, del inglés *intermediate metabolizers*): sujetos portadores de un alelo de pérdida de función y un alelo de función normal, o sujetos con un alelo de pérdida de función y otro alelo de ganancia de función. Es decir, portadores de los genotipos *CYP2C19* \*1/\*2, \*1/\*3 o \*2/\*17<sup>B</sup>.
- ❖ Metabolizadores normales (NM, del inglés *normal metabolizers*): sujetos con dos alelos normales, es decir, con genotipo *CYP2C19* \*1/\*1.
- ❖ Metabolizadores rápidos (RM, del inglés *rapid metabolizers*): sujetos con un alelo normal y otro de ganancia de función, es decir, con genotipo *CYP2C19* \*1/\*17.
- ❖ Metabolizadores ultrarrápidos (UM, del inglés *ultra-rapid metabolizers*): sujetos con dos alelos de ganancia de función, es decir, con genotipo *CYP2C19* \*17/\*17.

En el caso del tratamiento con clopidogrel, la presencia de polimorfismos no funcionales de *CYP2C19* se ha asociado con una hiporrespuesta a clopidogrel, puesto que al ser éste un profármaco y necesitar de su activación a través de *CYP2C19*, con una enzima no funcional se alcanzarán menores niveles de metabolito activo. Por tanto, estos pacientes mostrarán una menor eficacia y mayor riesgo de eventos adversos vasculares, incluida la trombosis del stent <sup>90-93</sup>. Recientemente Cavallari *et al.* demostraron un mayor riesgo de eventos cardiovasculares en pacientes con alelos no funcionales de *CYP2C19* a los que se les había prescrito clopidogrel en lugar de una terapia alternativa <sup>94</sup>.

Por el contrario, la presencia del alelo de función incrementada (*CYP2C19*\*17) ha demostrado una mayor inhibición plaquetaria y una hiperrespuesta a clopidogrel, pues una mayor formación de metabolito activo se traducirá en una mayor eficacia antiplaquetaria <sup>88,95-97</sup>. Debido a esto, estos pacientes también presentan un mayor

---

<sup>B</sup> Las consecuencias fenotípicas de la combinación de un alelo de pérdida de función (\*2) y un alelo de ganancia de función (\*17) aún se desconocen completamente, pero lo más probable es que el fenotipo se encuentre entre el NM y el IM, y muy posiblemente dependa del sustrato <sup>88,89</sup>.

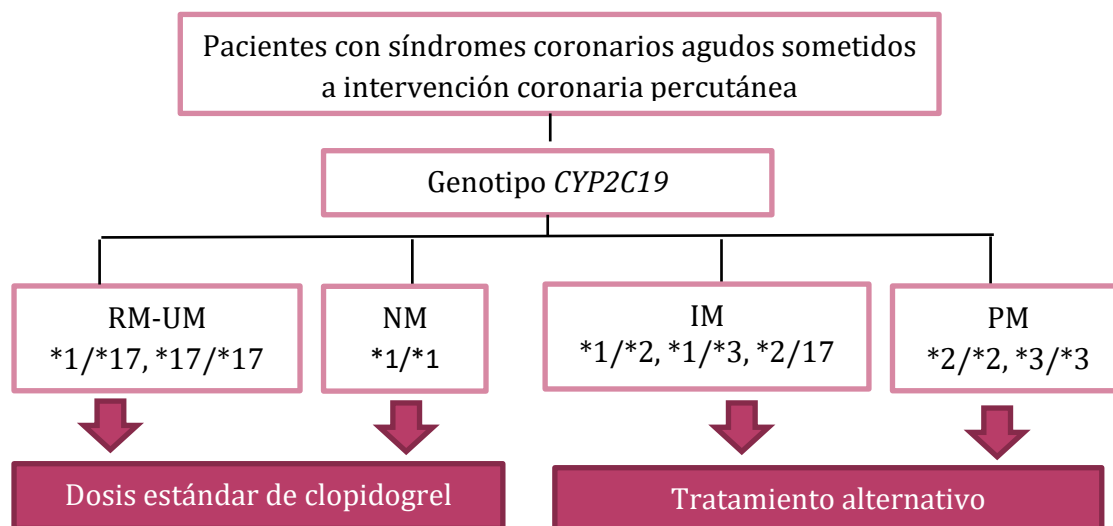
riesgo de sangrado <sup>92,98,99</sup>. Sin embargo, otros estudios no han identificado un efecto de este alelo <sup>100-102</sup>.

Estos resultados discrepantes que se encuentran en la literatura pueden deberse en parte al desequilibrio de ligamiento que existe entre el alelo \*17 y el \*2. Es decir, la presencia del alelo “T” de ganancia de función (\*17) siempre se produce en un haplotipo que también alberga el alelo “G” o *wild-type* del alelo \*2, por lo tanto, el efecto de ganancia de función podría deberse, en parte, a la ausencia del alelo de pérdida de función “A” del alelo \*2. Es por esto que se ha postulado que el efecto del alelo \*17 en el tratamiento con clopidogrel podría deberse al equilibrio de esta variante con el alelo \*2 <sup>102</sup>. En definitiva, hay una falta de evidencia del efecto independiente de este alelo en los resultados clínicos del tratamiento con clopidogrel.

En este sentido, en 2011 y posteriormente en 2013, el CPIC realizó una serie de recomendaciones terapéuticas basadas en el genotipo de *CYP2C19* para el tratamiento de síndromes coronarios agudos con clopidogrel <sup>84</sup>. El objetivo de estas recomendaciones terapéuticas es ajustar el tratamiento para maximizar el beneficio al reducir el riesgo de eventos adversos isquémicos o hemorrágicos <sup>84,103</sup>. Según estas recomendaciones, los pacientes NM y RM-UM <sup>c</sup> pueden tomar las dosis estándar de clopidogrel según indique la ficha técnica. Sin embargo, se recomienda que los pacientes IM y PM con síndrome coronario agudo y sometidos a intervención coronaria percutánea reciban una terapia antiplaquetaria alternativa, como el tratamiento con prasugrel o ticagrelor, porque no alcanzarían un efecto antiagregante adecuado con clopidogrel <sup>84,104</sup> (figura 15).

---

<sup>c</sup> Nótese que en 2013, fecha de la publicación de las guías, se denominaba con el fenotipo UM (*ultra-rapid metabolizer*) a la presencia del alelo \*17, ya fuera en heterocigosis (\*1/\*17) u homocigosis (\*17/\*17). Tras la publicación, en 2017, de la estandarización de términos <sup>87</sup>, los sujetos \*1/\*17 pasaron a ser RM (*rapid metabolizers*) y los sujetos \*17/\*17 UM (*ultra-rapid metabolizers*).



**Figura 15.** Recomendaciones del CPIC para el tratamiento con clopidogrel en pacientes con síndrome coronario agudo sometidos a intervención coronaria percutánea.

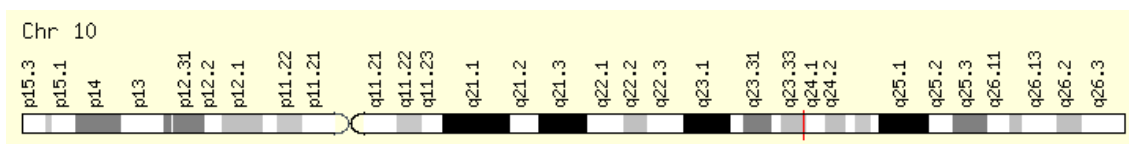
### Otras enzimas del citocromo P450

Los dos pasos oxidativos necesarios para la formación de metabolito activo requieren de la actividad de varias enzimas del citocromo P450, siendo muchas de ellas bastante polimórficas. Aunque la evidencia actual muestra una mayor contribución de CYP2C19, varios estudios han demostrado que otras enzimas también son de relevancia en la respuesta a clopidogrel.

#### *CYP2C9/CYP2C8*

La figura 16 muestra el contexto genético de los genes *CYP2C9* y *CYP2C8*. El gen *CYP2C9* se encuentra en el cromosoma 10 (banda citogenética 10q23.33; chr10:94.938.658-94.989.391 GRCh38/hg38) y contiene 50.734 bases, con 9 exones. Hasta la fecha se han registrado 68 alelos de *CYP2C9* en la plataforma PharmVar (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2C9>)<sup>105</sup>. Los alelos de pérdida de función más frecuentes son *CYP2C9*\*2 (rs1799853) y *CYP2C9*\*3 (rs1057910), con una frecuencia del alelo minoritario del 12% y del 7% en población europea, respectivamente<sup>21</sup>.





**Figura 16.** Contexto genético de los genes *CYP2C9* y *CYP2C8*.

El gen *CYP2C8* también se encuentra localizado en el cromosoma 10 (banda citogenética 10q23.33; chr10:95.036.772-95.069.498 GRCh38/hg38) y contiene 32.727 bases, con 17 exones. Hasta la fecha hay registrados 16 alelos de *CYP2C8* en la plataforma PharmVar (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2C8>) <sup>105</sup>. Los alelos de pérdida de función más frecuentes son *CYP2C8*\*2 (rs11572103), *CYP2C8*\*3 (rs10509681) y *CYP2C8*\*4 (rs1058930), con una frecuencia del 0,4%, 12% y 5,8% en población europea, respectivamente <sup>21</sup>.

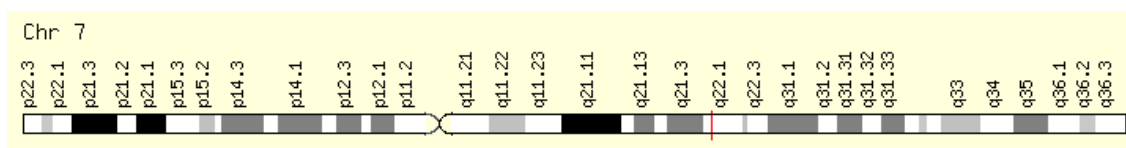
Un estudio GWAS identificó trece SNP dentro del cromosoma 10 en el *cluster CYP2C18-CYP2C19-CYP2C9-CYP2C8* asociados a una disminución de la respuesta a clopidogrel <sup>100</sup>. Sin embargo, existe controversia entre la asociación de los alelos más estudiados de *CYP2C9* (\*2 y \*3) y el efecto del clopidogrel. Mientras que algunos autores no han encontrado relación significativa <sup>95</sup> otros asocian la presencia del alelo \*3 alelo con una mayor incidencia de trombosis del stent <sup>106</sup>.

### *CYP3A4/CYP3A5*

El gen *CYP3A4* se encuentra en el cromosoma 7 (banda citogenética 7q22.1; chr7:99.756.960-99.784.265 GRCh38/hg38) (figura 17) y contiene 27.306 bases, con 19 exones. En la plataforma PharmVar hay recogidos 52 alelos de *CYP3A4* (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP3A4>) <sup>105</sup>. Los polimorfismos *CYP3A4*\*20 (rs67666821) y *CYP3A4*\*22 (rs35599367) se han asociado a una pérdida total y parcial, respectivamente, de la función de la enzima. *CYP3A4*\*20 se encuentra con una frecuencia inferior al 0,1% en población europea. Sin embargo, se ha descrito una

## I. Introducción

frecuencia de hasta 1,2% en la población española, debido a un efecto fundador <sup>107</sup>. La frecuencia del alelo *CYP3A4*\*22 es del 5% en población europea.



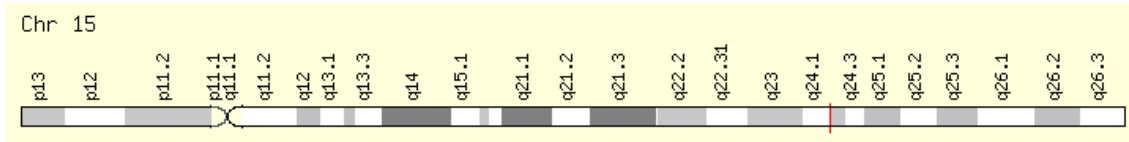
**Figura 17.** Contexto genético de *CYP3A4* y *CYP3A5*.

El gen *CYP3A5* también se localiza en el cromosoma 7 (banda citogenética 7q22.1; chr7:99.648.189-99.680.026 GRCh38/hg38) (figura 17) y tiene un tamaño de 31.838 bases, con 39 exones. Hasta la fecha se han recogido 24 alelos de *CYP3A5* (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP3A5>) <sup>105</sup>. En concreto, los alelos *CYP3A5*\*3 (rs776746) y *CYP3A5*\*6 (rs10264272) producen una proteína truncada que resulta en la ausencia de expresión de *CYP3A5* <sup>108</sup>. Estos se encuentran presentes en población europea con una frecuencia del 94,3% y 0,3%, respectivamente.

La actividad reducida del *CYP3A4* se ha asociado con un mayor riesgo de trombosis del stent en pacientes con síndrome coronario agudo tratados con clopidogrel <sup>109</sup>. Además, un estudio postula que el papel de *CYP3A4/5* en el metabolismo del clopidogrel puede ser de mayor relevancia de lo que se ha descrito previamente <sup>110</sup>.

### *CYP1A2*

El gen *CYP1A2* se encuentra en el cromosoma 15 (banda citogenética 15q24.1; chr15:74.74.843-74.756.600 GRCh38/hg38) (figura 18) y contiene 7.758 bases, con 9 exones. En la plataforma PharmVar hay recogidos 41 alelos de *CYP1A2* (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP1A2>) <sup>105</sup>. Los alelos más frecuentemente estudiados son *CYP1A2*\*1C (rs2069514), *CYP1A2*\*1F (rs762551) y *CYP1A2*\*1B (rs2470890), con una frecuencia en población europea del 2%, 32% y 40%, respectivamente. El alelo *CYP1A2*\*1C produce una funcionalidad enzimática disminuida, mientras que \*1F y \*1B conllevan una mayor inducibilidad.

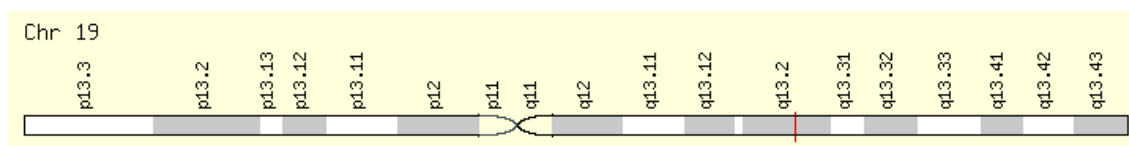


**Figura 18.** Contexto genético de *CYP1A2*.

En cuanto a la asociación de polimorfismos en *CYP1A2* y la respuesta a clopidogrel, no hay una evidencia clara. Se ha descrito que el alelo *CYP1A2*\*1F no se asocia con una mayor incidencia de eventos adversos cardiacos en pacientes con enfermedad de la arteria coronaria <sup>111</sup>. Por el contrario, Cresci *et al.* describen un mayor riesgo de eventos hemorrágicos asociados al alelo *CYP1A2*\*1C en población afroamericana con infarto agudo de miocardio <sup>112</sup>.

### *CYP2B6*

El gen *CYP2B6* se encuentra en el cromosoma 19 (banda citogenética 19q13.2; chr19:40.991.229-41.018.398 GRCh38/hg38) (figura 19) y contiene 27.170 bases, con 31 exones. En la plataforma PharmVar hay recogidos 63 alelos de *CYP2B6* (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2B6>) <sup>105</sup>.

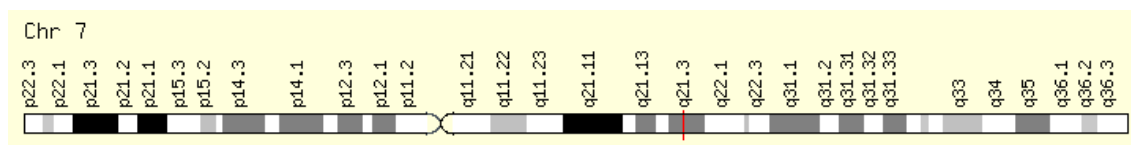


**Figura 19.** Contexto genético de *CYP2B6*.

Los alelos *CYP2B6*\*5 (rs3211371) y \*9 (rs3745274), con una frecuencia en población europea del 11% y 23%, conllevan una menor actividad enzimática. Estos alelos no se han asociado a una respuesta diferente a clopidogrel en pacientes con enfermedad arterial coronaria <sup>111,113,114</sup>. Se desconoce su implicación en pacientes sometidos a neurointervencionismo.

### PON1

El gen *PON1* se encuentra en el cromosoma 7 (banda citogenética 7q21.3; chr7:95.297.676-95.324.707 GRCh38/hg38) (figura 20) y contiene 27.032 bases, con 11 exones.

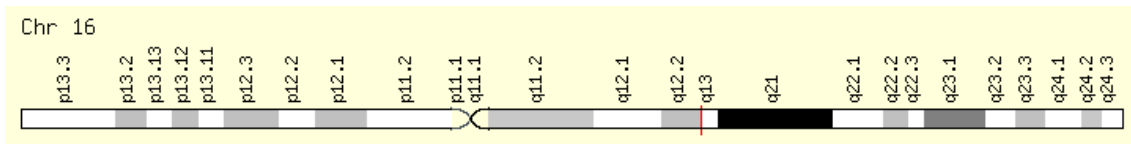


**Figura 20.** Contexto genético de *PON1*.

Se han descrito numerosos SNP en el gen *PON1*, en concreto 8 en la región promotora y 176 en la región codificante <sup>115</sup>, algunos de ellos modificando los niveles de expresión y actividad de la enzima. En concreto, dos SNP en la región codificante, L55M (rs854560) y Q192R (rs662), con una frecuencia en población europea del 36% y 29%, respectivamente, se han asociado con una menor actividad y concentración de PON1 <sup>116-118</sup>. PON1 se ha propuesto como una de las enzimas cruciales para la bioactivación de clopidogrel. Se trata de una esterasa sintetizada en el hígado y asociada con la molécula HDL en sangre. Además, participa en el metabolismo de 2-oxo-clopidogrel a su metabolito activo. El polimorfismo Q192R (rs662) presente en *PON1* condiciona la formación del metabolito activo <sup>75</sup>. En una población de pacientes con enfermedad arterial coronaria tratados con un stent, se ha descrito un mayor riesgo de trombosis del stent en individuos con genotipo Q/Q <sup>75</sup>.

### CES1

El gen *CES1* se encuentra en el cromosoma 16 (banda citogenética 16q12.2; chr16:55.802.851-55.833.337 GRCh38/hg38) (figura 21) y contiene 30.487 bases, con 21 exones. Marsh *et al.* identificaron 16 SNP en *CES1* en población africana y europea <sup>119</sup>.



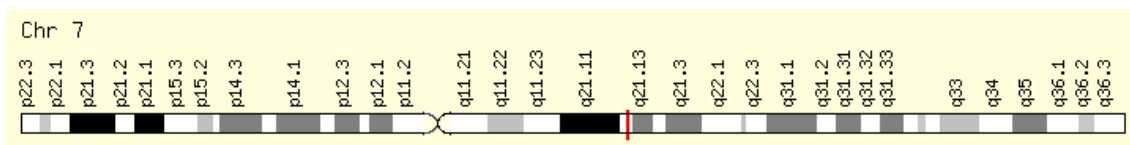
**Figura 21.** Contexto genético de *CES1*.

*CES1* es una serina esterasa ampliamente expresada y la principal enzima encargada de metabolizar el clopidogrel y su metabolito intermedio (2-oxo-clopidogrel) en sus derivados de ácido carboxílico, biológicamente inactivos <sup>120</sup>. Puesto que *CES1* se encarga de metabolizar el 85% de clopidogrel, variaciones genéticas que afecten a la expresión y/o actividad de *CES1* pueden ser de gran relevancia para el tratamiento con clopidogrel, puesto que aumentarán la cantidad de metabolito activo que se forma.

De hecho, un polimorfismo descrito en *CES1*, G143E (rs71647871), con una frecuencia del 1%, se ha asociado con un descenso de la funcionalidad de la proteína <sup>121</sup>. Lewis *et al.* comprobaron que en consonancia con lo esperado, los portadores del alelo mutado mostraron mayores niveles de metabolito activo y una mejor respuesta a clopidogrel en pacientes con enfermedad coronaria <sup>120</sup>.

## ABCB1

El gen *ABCB1* se encuentra en el cromosoma 7 (banda citogenética 7q21.12; chr7:87.503.633-87.713.323 GRCh38/hg38) (figura 22) y contiene 209.691 bases, con 30 exones.



**Figura 22.** Contexto genético de *ABCB1*.

La proteína asociada a membrana que codifica *ABCB1*, la P-gp, es un miembro de la superfamilia ABC de transportadores dependientes de ATP. Este transportador es un

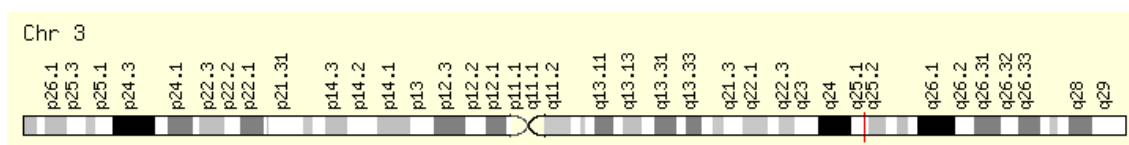
## I. Introducción

miembro de la subfamilia MDR/TAP (del inglés *Multidrug resistance, Transporter associated to Antigen Processing*). La P-gp actúa como bomba de eflujo de fármacos y compuestos xenobióticos con amplia especificidad de sustrato <sup>33</sup>.

El gen *ABCB1* es altamente polimórfico ya que se han descrito al menos 38 variantes <sup>122</sup>. Entre ellas, la variante más comúnmente estudiada es *ABCB1* C3435T (rs1045642). Varios estudios han descrito la influencia del polimorfismo C3435T en el tratamiento con clopidogrel. Taubert *et al.* describieron menores niveles de clopidogrel y su metabolito en pacientes portadores del genotipo T/T, probablemente como consecuencia de un mayor flujo intestinal debido a una mayor expresión de la P-gp en estos sujetos <sup>71</sup>. Además, la presencia del genotipo T/T se asoció con una mayor incidencia de eventos cardiovasculares en pacientes con infarto agudo de miocardio tratados con clopidogrel <sup>123</sup>. Sin embargo, esto es contrario a lo que cabría esperar puesto que se ha descrito que el alelo T reduce la expresión de la proteína <sup>124–127</sup> y, por tanto, se esperaría que produzca una mayor absorción y menor eliminación. Si esto es así, los pacientes portadores del genotipo T/T deberían alcanzar concentraciones más altas de clopidogrel y su metabolito activo. Otros dos SNP, C1236T y G2677T/A, se encuentran en desequilibrio de ligamiento parcial con C3435T ( $R^2 = 0,52$  en población IBS) <sup>128</sup>, por lo que es recomendable estudiar los 3 SNP en conjunto para poder discernir cuál de ellos es el más relevante en el transporte de sustratos de P-gp.

## P2Y<sub>12</sub>

El gen *P2RY12* se encuentra en el cromosoma 3 (banda citogenética 3q25.1; chr3:151.336.843-151.384.812 GRCh38/hg38) (figura 23) y contiene 47.970 bases, con 6 exones.



**Figura 23.** Contexto genético de *P2RY12*.

*P2RY12* es el gen que codifica para el receptor acoplado a proteína-G  $P2Y_{12}$ . Como ya se ha descrito previamente, está implicado en la agregación plaquetaria y es una de las moléculas diana para el tratamiento de tromboembolismos. Se han descrito múltiples polimorfismos en este gen, aunque su implicación en la funcionalidad del receptor requiere de más investigación. En concreto, algunos polimorfismos que conforman el haplotipo H1 y el haplotipo H2 (rs10935838, rs2046934, rs5853517 y rs6809699) se han asociado a una mayor reactividad plaquetaria en el tratamiento con clopidogrel<sup>129,130</sup>. Sin embargo, estas asociaciones descritas no han sido replicadas y el nivel de evidencia es bajo. Es necesario profundizar en el análisis de polimorfismos en *P2RY12* para conocer su implicación en la respuesta a clopidogrel.

#### 4.5. Farmacogenética del clopidogrel en pacientes sometidos a procesos neurointervencionistas

Aunque en la literatura científica hay multitud de trabajos que investigan la influencia de *CYP2C19* en el efecto de clopidogrel, la mayoría de ellos se centran en un subgrupo de pacientes muy concreto: pacientes con trastornos cardiológicos, especialmente aquellos con síndrome coronario agudo sometidos a intervención coronaria percutánea. Esto significa que la mayoría de los datos generados derivan de la investigación de patología cardíaca. Por lo tanto, la investigación en este campo es muy asimétrica, puesto que algunas afecciones médicas no se han investigado en profundidad. Este es el caso de los trastornos cerebrovasculares corregidos mediante procedimientos neurointervencionistas, para los que el tratamiento con clopidogrel y ácido acetilsalicílico también es la primera opción terapéutica. Es evidente que la extrapolación de evidencias de un grupo de pacientes a otros no es el enfoque apropiado teniendo en cuenta la especificidad de los antecedentes, la condición médica o el tratamiento específico de cada grupo de pacientes, que pueden influir sobre el resultado terapéutico.

La intervención endovascular está sustituyendo a los procedimientos de cirugía abierta para el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares. Con todo, hasta el 9%

de los pacientes que se someten a procedimientos neurointervencionistas desarrollan complicaciones tromboembólicas <sup>131</sup>. La doble terapia antiplaquetaria disminuye la aparición de acontecimientos adversos vasculares hasta en un 75-80% en los pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea, efecto que se asemejaría similar en la cohorte de pacientes sometidos a neurointervencionismo <sup>131</sup>. Sin embargo, hay un subgrupo de pacientes hiporrespondedores a clopidogrel que se estima del 5-30% en población cardiovascular y de hasta un 66% en pacientes bajo neurointervencionismo <sup>131</sup>.

Teniendo en cuenta que los pacientes sometidos a procedimientos neurointervencionistas representan una cohorte de pacientes muy heterogénea y que no existe una guía estandarizada para condiciones neurovasculares basadas en el genotipo de *CYP2C19*, es crucial ampliar el conocimiento del efecto de clopidogrel en esta cohorte.

Este tipo de exploraciones se basan en la asociación de los genotipos de *CYP2C19* con la agregometría y/o el análisis del desenlace terapéutico, entendido como la aparición de efectos adversos. En este sentido, hay varias publicaciones que estudian el efecto de clopidogrel con relación a los distintos perfiles metabolizadores:

- ❖ Zhu *et al.* realizaron un estudio de asociación entre los polimorfismos de *CYP2C19* y la eficacia clínica de la terapia con clopidogrel en 241 pacientes asiáticos tras un accidente cerebrovascular isquémico, sometidos a la colocación de un stent en la arteria carótida. Los pacientes fueron seguidos durante un año después de la intervención y se consideró como desenlace principal la aparición de eventos isquémicos posteriores. Encontraron que la presencia de los alelos de pérdida de función *CYP2C19*\*2 y \*3 era un factor de riesgo en el pronóstico. En concreto, los pacientes portadores de alguna de estas variantes tenían más probabilidades de padecer un evento isquémico posterior que aquellos individuos con genotipo *wild-type*. Además, comprobaron que no existían diferencias significativas en el



pronóstico entre los dos alelos <sup>132</sup>. En este estudio no se analizó el alelo *CYP2C19*\*17.

- ❖ González *et al.* analizaron la influencia de los fenotipos de *CYP2C19* sobre la respuesta a clopidogrel basal y sobre el efecto farmacodinámico del ajuste de dosis de clopidogrel (dosis estándar o dosis alta) en 209 pacientes sometidos a la colocación de un stent en la arteria carótida, y con alta reactividad plaquetaria durante el tratamiento. Analizaron la reactividad plaquetaria antes y 30 días después de la colocación del stent. Encontraron menor efecto antiagregante estadísticamente significativo en los pacientes IM/PM en comparación con los UM y NM. Además, el número de pacientes no respondedores era significativamente mayor entre el grupo IM/PM. En cuanto a las dosis, el uso de dosis altas de clopidogrel no produjo reducciones estadísticamente significativas de la reactividad en comparación con la dosis estándar <sup>113</sup>.
- ❖ Ge *et al.* midieron los efectos de clopidogrel sobre la agregometría de 215 pacientes con aneurismas intracraneales tratados mediante embolización vía coils asistida con stent. Comprobaron que los portadores de los alelos *CYP2C19*\*2 y \*3, especialmente los PM, tenían un mayor riesgo de resistencia a clopidogrel, mientras que el fenotipo NM se asoció significativamente con la incidencia de eventos hemorrágicos <sup>133</sup>. En este estudio no se incluyó el alelo *CYP2C19*\*17.
- ❖ Colley *et al.* publicaron una revisión sobre la implicación del alelo *CYP2C19*\*2 en los procedimientos neurointervencionistas, mostrando que el ser portador de este alelo se asocia a una hiporrespuesta a clopidogrel <sup>131</sup>.
- ❖ Lin *et al.* analizaron la respuesta a clopidogrel en 108 pacientes sometidos a neurointervención por aneurismas intracraneales o estenosis. No encontraron asociación con los alelos *CYP2C19*\*2 y \*3, sin embargo, concluyeron que el ser

portador del alelo *CYP2C19*\*17, contrario a lo esperable, está relacionado con la incidencia de eventos isquémicos, independientemente del efecto de clopidogrel. No obstante, mencionan la necesidad de confirmar la influencia de este alelo en el desenlace clínico de los pacientes sometidos a tratamiento endovascular <sup>134</sup>.

Todos estos estudios sugieren que la presencia de alelos de pérdida de función está asociada con la resistencia a clopidogrel y la incidencia de eventos isquémicos, lo que está en consonancia con los estudios en pacientes con síndrome coronario agudo. Sin embargo, la influencia del alelo *CYP2C19*\*17 no está tan clara, incluso es contradictoria a lo que cabría esperar. Se necesita una investigación más exhaustiva para confirmar estos resultados y superar las limitaciones de estos estudios.

### 4.6. Uso de medicación concomitante. Inhibidores de la bomba de protones.

Puesto que el clopidogrel es parcialmente metabolizado por la enzima *CYP2C19*, el uso de fármacos que inhiban la actividad de esta enzima podría afectar a la formación de metabolito activo y, por tanto, verse reducida la eficacia clínica.

Entre los fármacos que inhiben el *CYP2C19* se incluyen los inhibidores de la bomba de protones (IBP) como omeprazol y esomeprazol, antidepresivos como fluvoxamina, fluoxetina y moclobemida, antifúngicos como voriconazol y fluconazol, antibióticos como ciprofloxacino y cloranfenicol, antagonistas de los receptores H<sub>2</sub> como cimetidina, anticonvulsivantes como carbamazepina y oxcarbazepina y el antiagregante ticlopidina <sup>65</sup>.

Los IBP son una de las familias de medicamentos más ampliamente prescritos. Sin embargo, como todos los fármacos, no están libres de causar efectos secundarios. En particular, se ha descrito una fuerte interacción entre los IBP y el clopidogrel. Aunque la evidencia de inhibición varía entre la familia de IBP, se considera que todos ellos inhiben la actividad de *CYP2C19*, siendo omeprazol y esomeprazol los que tienen un mayor efecto y dexlansoprazol y lansoprazol los de menor efecto <sup>135</sup>. Por tanto, el uso concomitante de IBP debe evitarse a menos que se necesite incondicionalmente <sup>136</sup>.

## 5. JUSTIFICACIÓN

El tratamiento con clopidogrel representa un riesgo para aquellos pacientes con alelos defectivos de la enzima CYP2C19 con síndrome coronario agudo sometidos a intervención percutánea. Sin embargo, el papel de esta enzima y el resto de los genes implicados en el metabolismo y mecanismo de acción de clopidogrel no son tan conocidos en pacientes con afecciones cerebrovasculares sometidos a neurointervencionismo percutáneo. Actualmente no existen guías que recomienden un procedimiento estandarizado ante la presencia de polimorfismos en estos genes para esta cohorte de pacientes.

Además, el tratamiento con clopidogrel es ineficaz en un alto porcentaje de pacientes, pudiendo desencadenar en reacciones adversas graves debidas a su falta de eficacia, como eventos trombóticos recurrentes. En la práctica clínica, el uso de nuevos agentes terapéuticos antiagregantes como prasugrel o ticagrelor, normalmente muy caros, con frecuencia compensa la falta de información farmacogenética. Este hecho no está justificado, puesto que la información farmacogenética no debería verse como un método de decisión exclusivo, sino complementario al resto de información del paciente <sup>137</sup>. De hecho, en un estudio reciente de Moore *et al.* que comparaba la eficacia, seguridad y costes del tratamiento con ticagrelor en comparación con clopidogrel en pacientes con aneurismas cerebrales tratados con derivador de flujo, comprobaron que no hubo diferencias en la incidencia de eventos isquémicos y/o hemorrágicos, aunque el tamaño muestral era muy pequeño (50 pacientes en el grupo de ticagrelor y 53 en el grupo de clopidogrel) <sup>138</sup>. Sin embargo, concluyen que, siendo el coste de ticagrelor mucho más elevado, el uso de esta terapia alternativa debe quedar reservado a aquellos pacientes con hiporrespuesta al clopidogrel <sup>138</sup>. Además, habría que tener en cuenta que ticagrelor y prasugrel no están autorizados para el tratamiento de enfermedades neurológicas <sup>139,140</sup>. De hecho, prasugrel está contraindicado en pacientes con historia de ictus o AIT <sup>139</sup>.

## I. Introducción

Por lo tanto, estudiando el papel de los polimorfismos en los principales genes que regulan el metabolismo y mecanismo de acción de clopidogrel, podemos tratar de explicar esa variabilidad en la respuesta. Además, esto nos permitirá desarrollar modelos predictores que faciliten la labor asistencial al prescribir clopidogrel sólo al subgrupo de pacientes en los que sepamos *a priori* que va a ser eficaz y con un menor riesgo de reacciones adversas.



## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## 1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La variabilidad en la respuesta a clopidogrel puede estar relacionada con polimorfismos de genes implicados en su farmacocinética o farmacodinamia. La mayor parte de la evidencia de asociación entre polimorfismos y respuesta a clopidogrel se ha dado en torno a la enzima CYP2C19, en pacientes con síndrome coronario agudo sometidos a intervención percutánea. Asimilando estos resultados en nuestra cohorte de pacientes, nuestras principales hipótesis son:

- ❖ Los sujetos con alelos de actividad reducida (*CYP2C19\*2* y/o *CYP2C19\*3*) formarán menos metabolito activo y, por tanto, responderán peor al tratamiento con clopidogrel, por lo que pueden presentar un mayor riesgo de eventos trombóticos recurrentes.
- ❖ Los sujetos portadores del alelo de actividad incrementada *CYP2C19\*17* formarán más metabolito activo y por tanto responderán de forma exagerada al tratamiento con clopidogrel, pudiendo presentar un mayor riesgo de eventos hemorrágicos.

Por otra parte, puesto que son muchos los factores implicados en el metabolismo, transporte y mecanismo de acción de clopidogrel, muchos podrían condicionar la variabilidad en la respuesta interindividual al clopidogrel. Por tanto, nuestras hipótesis secundarias son:

- ❖ Los sujetos portadores de alelos con reducción de la actividad de *CES1* metabolizarán menor cantidad de clopidogrel a su metabolito inactivo, por lo que se formará más metabolito activo. De esta forma, los pacientes responderán mejor al tratamiento con clopidogrel.
- ❖ Los sujetos con alelos de actividad reducida en *CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP3A4/5* y *PON1* formarán menos metabolito activo y por tanto responderán peor al tratamiento con clopidogrel, por lo que pueden presentar un mayor riesgo de eventos trombóticos recurrentes.

## II. Hipótesis y objetivos

- ❖ Los polimorfismos presentes en *ABCB1* alterarán la absorción intestinal de clopidogrel y por tanto afectarán a la biodisponibilidad del mismo. Los sujetos portadores de alelos con función reducida de *ABCB1* tendrán mayores concentraciones de fármaco y por ende podrían responder mejor al tratamiento con clopidogrel, con un menor riesgo de eventos trombóticos.
- ❖ Los polimorfismos presentes en el gen *P2RY12*, podrían alterar la funcionalidad del receptor plaquetario y por tanto influir en la agregación plaquetaria.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, conocer los factores que condicionan la respuesta a clopidogrel nos permitirá predecir que pacientes responderán mejor al tratamiento y cuáles tendrán mayor riesgo de desarrollar eventos hemorrágicos o isquémicos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

El objetivo de este estudio es identificar los factores genéticos que condicionan la respuesta a clopidogrel en pacientes sometidos a neurointervencionismo percutáneo.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Describir las características demográficas y clínicas de los pacientes sometidos a neurointervencionismo percutáneo.
2. Describir el desenlace clínico de esta cohorte de pacientes. Detallar el valor de agregometría plaquetaria, la duración del tratamiento, los requerimientos de reducción de dosis y/o cambios de tratamiento y la incidencia eventos isquémicos y hemorrágicos posteriores.
3. Describir las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos estudiados en los genes relacionados con el metabolismo (*CES1*, *CYP2C19*, *CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP3A4/5* y *PON1*), transporte (*ABCB1*) y mecanismo de acción de clopidogrel (*P2RY12*).

4. Identificar las variantes genéticas asociadas a la respuesta a clopidogrel en una cohorte de pacientes sometidos a neurointervencionismo percutáneo, mediante un estudio de genes candidatos involucrados en su metabolismo, transporte y mecanismo de acción.
5. Analizar la influencia del uso de medicación concomitante en el desenlace clínico de los pacientes tratados con clopidogrel.





### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

## 1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Este es un estudio observacional retrospectivo realizado mediante la recopilación y análisis de los datos clínicos de pacientes sometidos a procesos de neurointervencionismo vascular que recibieron tratamiento con clopidogrel.

Se analizaron un total de 144 pacientes, los cuales fueron intervenidos en el Servicio de Radiología Vascular del Hospital Universitario de La Princesa. Los pacientes fueron remitidos a la Unidad de Farmacogenética del Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario de La Princesa para el análisis de los polimorfismos *CYP2C19* \*2, \*3 y \*17. Se incluyeron todos aquellos pacientes analizados entre mayo de 2013 y octubre de 2018.

### 1.1. Criterios de inclusión

Pacientes mayores de edad sometidos a neurointervencionismo vascular en el Servicio de Radiología Vascular del Hospital Universitario de la Princesa y en tratamiento con clopidogrel de al menos un día de duración y con un seguimiento de al menos 30 días.

### 1.2. Criterios de exclusión

Pacientes que habiendo sido sometidos a neurointervencionismo vascular no recibieron clopidogrel como fármaco antiagregante.

## 2. INFORMACIÓN RECOGIDA

### 2.1. Variables demográficas y clínicas

Los datos recopilados procedían de las historias clínicas de los pacientes, recogándose la siguiente información:

- ❖ Factores demográficos: edad y sexo.
- ❖ Factores de riesgo cardiovascular: hipertensión, dislipemia, obesidad, diabetes mellitus, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrilación auricular,

### III. Materiales y métodos

infarto agudo de miocardio o eventos isquémicos o hemorrágicos previos, tabaquismo.

- ❖ Tipo de intervención: embolización o angioplastia mediante el uso de derivador de flujo, stent o coil.
- ❖ Motivo de la intervención: estenosis o aneurisma.
- ❖ Tratamiento concomitante: IBP, ácido acetilsalicílico, heparina, antiinflamatorios no esteroideos, inhibidores de la recaptación de serotonina, inhibidores de la glicoproteína IIb/IIIa, etc.

#### 2.2. Desenlace clínico

La variable principal de desenlace clínico fue la aparición de un acontecimiento adverso posterior al tratamiento con clopidogrel, de tipo:

- ❖ Isquémico (AIT, ictus isquémico o re-estenosis del stent).
- ❖ Hemorrágico (hemorragia subaracnoidea, ictus hemorrágico u otras hemorragias que requiriesen la atención en urgencias, como epistaxis y hemoptisis). Los sangrados autolimitados (como sangrado de encías) que no requiriese de atención en urgencias no fueron considerados.

Se consideraron aquellos eventos que fueron registrados en la historia clínica del paciente, de acuerdo al criterio del clínico responsable, durante el periodo en que el paciente estaba recibiendo tratamiento con clopidogrel.

Además, se recogieron como variables secundarias:

- ❖ Valor de agregometría, como medida de respuesta antiplaquetaria.
- ❖ Duración del tratamiento.
- ❖ Reducción en la dosis de clopidogrel.
- ❖ Cambios de tratamiento.

### 2.3. Respuesta antiplaquetaria

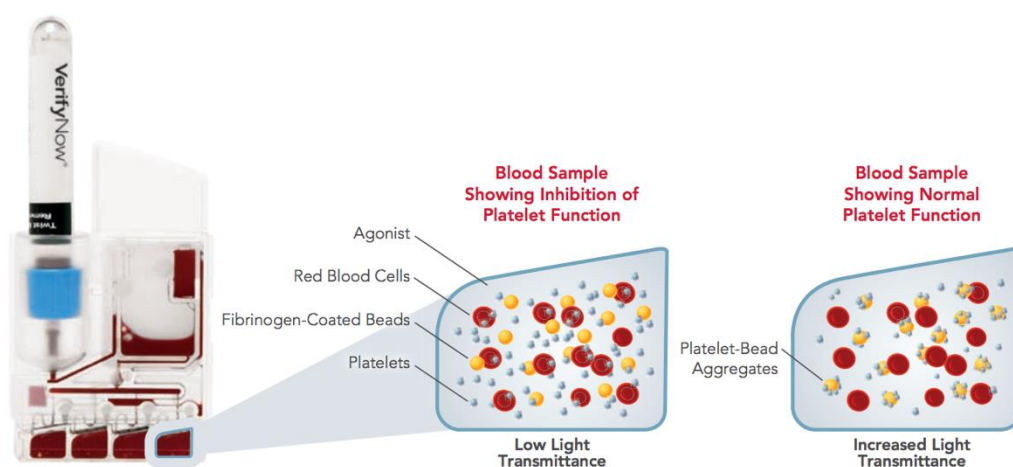
La respuesta antiplaquetaria se midió usando el equipo VerifyNow (Accriva Diagnostics, San Diego, CA). Se trata de un procedimiento que los radiólogos realizan de forma rutinaria antes de la intervención, cuando el paciente lleva varios días (un mínimo de 3) con una dosis de mantenimiento de clopidogrel de 75 mg/d.

El análisis, que se realiza en sangre total, mide los niveles de bloqueo del receptor plaquetario P2Y<sub>12</sub>, en unidades de reacción de P2Y<sub>12</sub> (PRU- del inglés *P2Y<sub>12</sub> reaction unit*), mediante la determinación de la agregación inducida por ADP. El ensayo incorpora el agonista ADP para activar las plaquetas, midiendo así la función plaquetaria en función de la capacidad de las plaquetas activadas para unirse al fibrinógeno. Las micropartículas revestidas con fibrinógeno se agregan en sangre total en proporción al número de receptores GP IIb/IIIa plaquetarios activados; y si el inhibidor de P2Y<sub>12</sub> ha producido el efecto antiplaquetario esperado, dicha agregación se verá reducida.

Las mediciones se realizaron con un tubo de extracción de sangre de 2 mL con citrato de sodio al 3,2%, que eran usados para la medición en un rango desde 10 min a 4 horas desde la extracción. Cada ensayo de un solo uso consta de un pocillo para la muestra, un pocillo distribuidor y cuatro pocillos de detección. El instrumento extrae automáticamente la sangre total en el dispositivo del ensayo desde el tubo de recolección de la muestra hasta el pocillo correspondiente. Luego la sangre se calienta a 37 °C y se continúa con el análisis de la sangre en los pozos de detección. Estos contienen una preparación liofilizada de perlas recubiertas con fibrinógeno humano y el agonista plaquetario ADP. Estas perlas recubiertas de fibrinógeno se unen a los receptores disponibles de las plaquetas en la muestra de sangre problema. Cuando las plaquetas activadas se exponen a las perlas recubiertas con fibrinógeno, la aglutinación se produce en proporción a la cantidad de receptores de plaquetas que haya disponibles. En presencia de fármacos inhibidores del receptor P2Y<sub>12</sub> las

### III. Materiales y métodos

plaquetas quedan inactivas y por tanto no pueden unirse al fibrinógeno para formar los agregados. El instrumento mide esta aglutinación como un aumento en la transmitancia de la luz a través de los pozos de detección y notifica el grado de agregación plaquetaria en unidades PRU. Estas unidades informan de la cantidad de agregación mediada por ADP específica para el receptor  $P2Y_{12}$ , y se calcula como una función de la velocidad y el grado de agregación. Esta medida da un valor del nivel de plaquetas que han reaccionado al efecto del fármaco inhibidor de  $P2Y_{12}$  (figura 24).



**Figura 24.** Esquema de la detección de los niveles de bloqueo del receptor plaquetario  $P2Y_{12}$  con el sistema VerifyNow.

Fuente: Verify Now Reference Guide (Accriva Diagnostics, San Diego, CA).

Valores inferiores a 180 PRU sugieren una correcta inhibición del receptor  $P2Y_{12}$ , mientras que valores superiores a 180 PRU muestran falta de efecto farmacológico debido a una baja inhibición del receptor. En base a estos valores determinados en la guía de referencia (Verify Now Reference Guide, Accriva Diagnostics, San Diego, CA) los pacientes fueron clasificados en:

- ❖ Respondedores a clopidogrel: valores de PRU menores a 180
- ❖ No respondedores a clopidogrel: valores de PRU iguales o mayores a 180

De esta forma, se mide el grado de agregación plaquetaria en los pacientes que hayan tomado clopidogrel antes de ser sometidos a la neurointervención percutánea, ajustándoles las dosis en base a una hiper o hipo respuesta a clopidogrel.

### 3. GENOTIPADO

#### 3.1. Extracción de ADN

El ADN genómico se extrajo a partir de 1 mL de sangre, recogida en un tubo EDTA K2 de 3 mL, utilizando el kit de aislamiento de ADN MagNA Pure LC en un extractor de ADN automático (MagNA Pure® System, Roche Applied Science, Indianápolis, Indiana).

Las muestras de sangre permanecieron almacenadas a 4 °C hasta un máximo de siete días antes de su procesamiento. Una vez extraído, se cuantificó la concentración de ADN (ng/μL) en el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, Delaware). Además, comprobamos la pureza de las muestras mediante la relación de absorbancia 260/280 nm ( $A_{260/280}$ ), considerando puras aquellas muestras con una  $A_{260/280}$  entre 1,8 y 2,0.

#### 3.2. Selección de polimorfismos

Como ya hemos mencionado previamente, por motivos asistenciales, todos los pacientes eran genotipados para los polimorfismos *CYP2C19* \*2, \*3 y \*17. Puesto que se trata de un estudio de genes candidatos, para la selección del resto de polimorfismos a analizar nos basamos en el metabolismo de clopidogrel y su mecanismo de acción. Se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica de las variantes más relevantes asociadas a la respuesta a clopidogrel, identificadas en estudios de genes candidatos y GWAS. Finalmente, se seleccionaron un total de 35 polimorfismos en 11 genes codificantes de enzimas metabolizadoras (*CES1*, *PON1*, *CYP1A2*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2C8*, *CYP2C19*), el transportador P-gp (*ABCB1*) y el receptor P2Y<sub>12</sub> sobre el que actúa el fármaco (*P2RY12*) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Listado de genes y polimorfismos analizados, tipo de variante y consecuencias funcionales

Gen	Variante	Alelos* (MAF)	Tipo de variante	Cambio de aa	Consecuencia funcional
Citocromo P450					
CYP1A2	*1C/ rs2069514	G/A (0,21)	Localizada en extremo 5'	No	Menor actividad ez
	*1F/ rs762551	A/C (0,37)	Variante intrónica	No	Mayor inducibilidad
	*1B/ rs2470890	C/T (0,4)	Sinónimo	No	Mayor inducibilidad
CYP3A4	*20/ rs67666821	-/T (0,01)	Afecta al marco de lectura	Pro>Thr	Sin actividad ez
	*22/ rs35599367	G/A (0,01)	Variante intrónica	No	Menor actividad ez
CYP3A5	*3/ rs776746	T/C (T=0,11)	Empalme alternativo 3'	No	Sin actividad ez
	*6/ rs10264272	C/T (0,04)	Sinónimo	No	Sin actividad ez
CYP2B6	*9/ rs3745274	G/T (0,32)	Cambio de sentido	Gln>His	Menor actividad ez
	*5/ rs3211371	A/C/G/T (T=0,05)	Cambio de sentido	Arg>Ser/Gly/Cys	Menor actividad ez
CYP2C8	*2/ rs11572103	T/A (0,05)	Cambio de sentido	Ile>Phe	Menor actividad ez
	*3/ rs10509681	T/C (0,05)	Cambio de sentido	Lys>Arg	Menor actividad ez
	*4/ rs1058930	G/C (0,02)	Cambio de sentido	Ile>Met	Menor actividad ez
CYP2C9	*2/ rs1799853	C/T (0,05)	Cambio de sentido	Arg>Cys	Menor actividad ez
	*3/ rs1057910	A/C (0,05)	Cambio de sentido	Ile>Leu	Menor actividad ez
CYP2C19	*2/ rs4244285	G/A (0,22)	Sinónimo	No	Sin actividad ez
	*3/ rs4986893	G/A (0,01)	Sin sentido	Trp>Ter	Sin actividad ez
	*17/ rs12248560	C/T (0,15)	Variante intrónica	No	Mayor actividad ez
Otras enzimas					
CES1	G143E/ rs71647871	C/T (0,04)	Cambio de sentido	Gly>Glu	Sin actividad ez
PON1	Q192R/ rs662	C/T (0,46)	Cambio de sentido	Gln>Arg	Menor actividad ez
	L55M/ rs854560	A/C/G/N/T (T=0,18)	Cambio de sentido	Leu>Met	Menor actividad ez
	(-108C/T)/ rs705379	G/A (0,35)	5'-UTR	No	Desconocida
Transportador					
ABCB1	C3435T/ rs1045642	G/A (0,40)	Sinónimo	No	Reducida
	G2677TA/ rs2032582	C/A/T (A=0,33)	Cambio de sentido	Ser>Ala/Thr	Reducida
	C1236T/ rs1128503	G/A (0,42)	Sinónimo	No	Reducida
Receptor					
P2RY12	rs2046934	G/A (G=0,13)	Variante intrónica	No	Desconocida
	rs6787801	G/A (G=0,47)	Variante intrónica	No	Desconocida
	rs6798347	G/A (0,29)	Variante intrónica	No	Desconocida
	rs6809699	C/A (0,09)	Sinónimo	No	Desconocida

Gen	Variante	Alelos* (MAF)	Tipo de variante	Cambio de aa	Consecuencia funcional
P2RY12	rs9859552	G/T (0,06)	Variante intrónica	No	Desconocida
	E330G/ rs16846673	T/C (0,02)	Cambio de sentido	Glu>Gly	Desconocida
	rs6785930	G/A (0,24)	Sinónimo	No	El producto proteico puede estar alterado
	rs10935838	A/G (0,13)	Variante intrónica	No	Desconocida
	rs5853517	T/- (T=0,13)	Variante intrónica	No	Desconocida
	rs6801273	C/T (C=0,42)	Variante intrónica	No	Desconocida
	rs6787801	A/G (G=0,47)	Variante intrónica	No	Desconocida

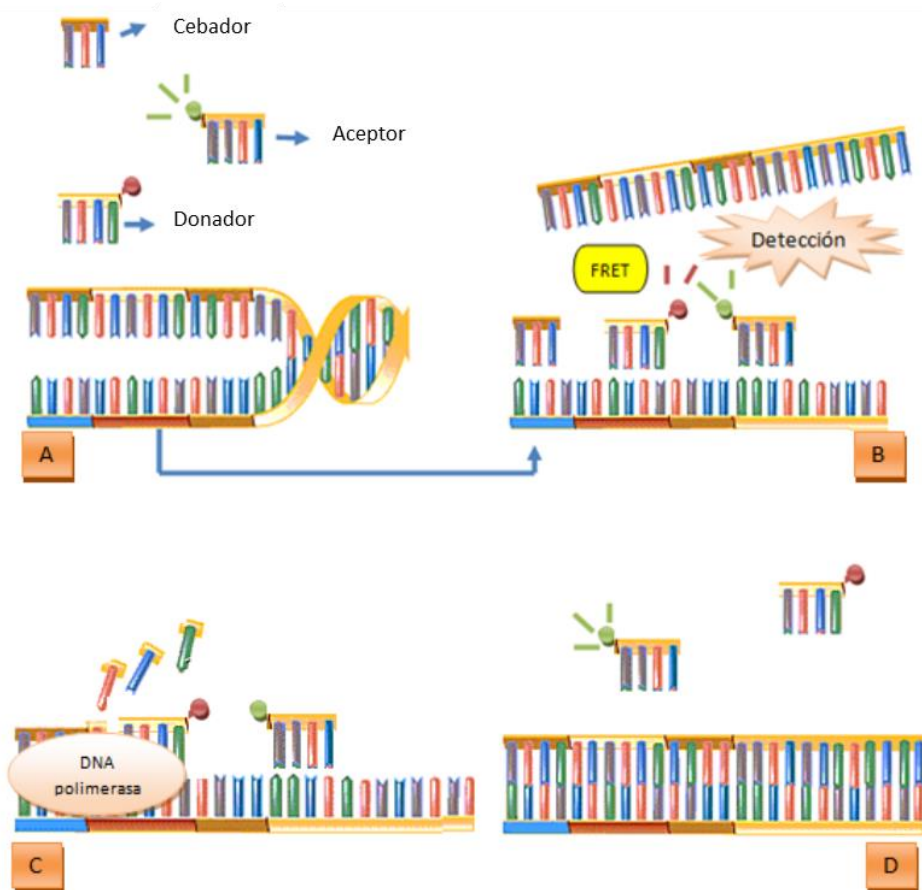
\*Alelos mostrados como *wild-type*/mutado. MAF descrita para el alelo mutado a no ser que se refleje entre paréntesis, en cuyo caso corresponde al alelo *wild-type*. Abreviaturas: MAF, Minor Allele Frequency; aa, aminoácido; ez, enzimática.

### 3.3. Genotipado mediante sondas de hibridación

Los polimorfismos *CYP2C19* \*2, \*3 y \*17 se analizaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real (qPCR). Para ello se utilizaron cebadores y sondas fluorescentes de hibridación diseñadas por TIB MOLBIOL (GmbH, Berlin, Alemania) en un termociclador LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), el cual posee tres canales de lectura que nos permiten analizar varios polimorfismos a la vez. Para aplicar esta tecnología, se usan dos sondas de hibridación (HybProbe, *hybridation probes*) complementarias a la secuencia de ADN problema, una de ellas está marcada con carboxifluoresceína (FAM) (fluoróforo donador) en su extremo terminal 3' y la otra está marcada en su extremo 5' con LightCycler® Red 640 (fluoróforo aceptor), bloqueado en su extremo 3'-hidroxilo con un fosfato para evitar su extensión. La técnica se basa en el principio conocido como FRET (del inglés *fluorescence resonance energy transfer*), por el cual la excitación de una fuente de luz (como un halógeno, láser o LED) provocará la excitación del fluoróforo donador y se produce una transferencia de energía al fluoróforo aceptor. Esto ocurre siempre y cuando la longitud de onda de emisión del donador se solape con la longitud de onda de excitación del aceptor. Este proceso da como resultado la emisión de luz a una longitud de onda específica del fluoróforo aceptor, que es detectada por el aparato (figura 25).



### III. Materiales y métodos

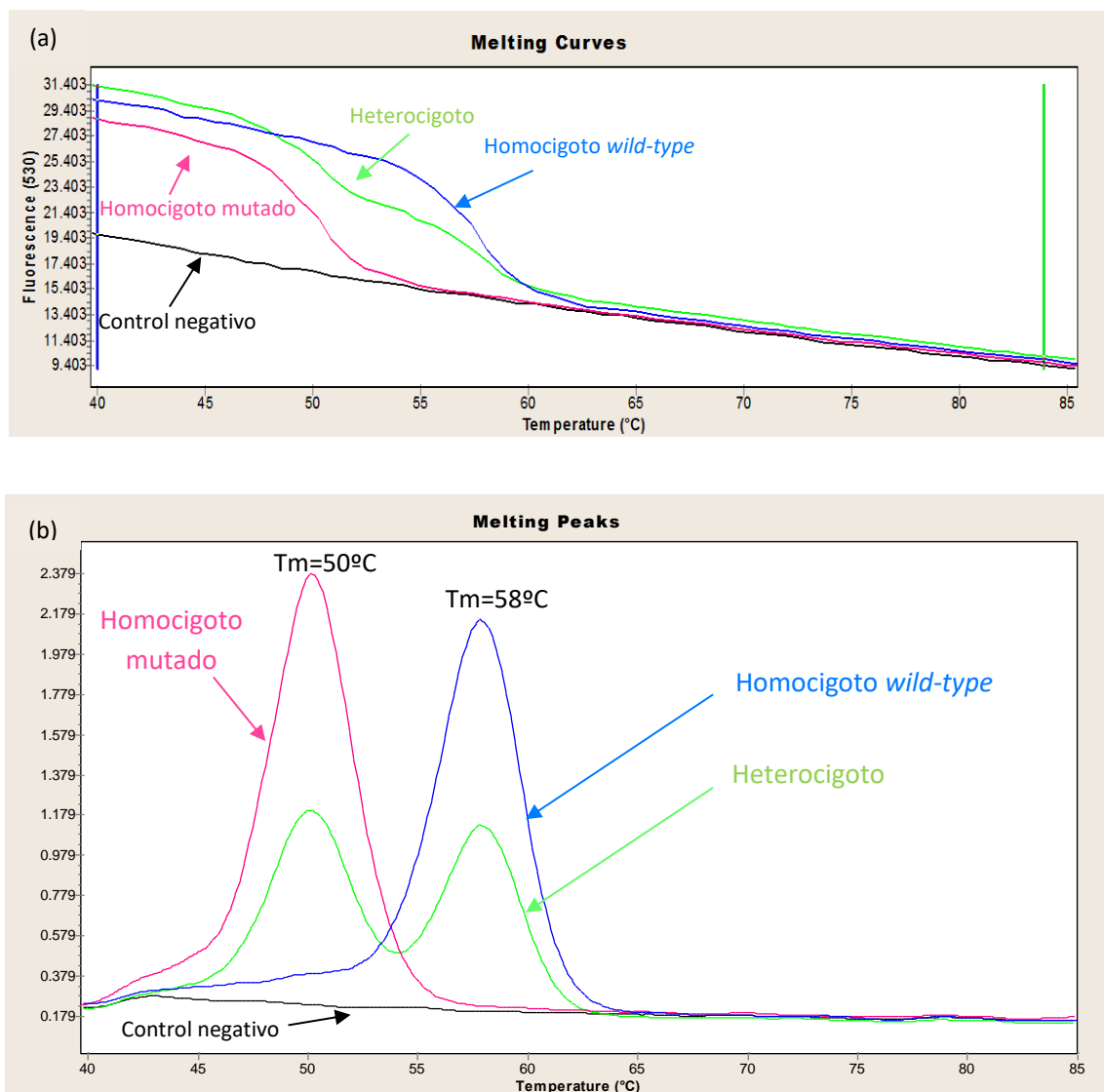


**Figura 25.** Esquema que muestra los pasos que tienen lugar en un ciclo de PCR a tiempo real, usando tecnología HybProbe.

A) La doble hélice de ADN se desnaturaliza. B) Unión de sondas y cebadores, detectándose la señal de fluorescencia tras la transferencia de energía del fluoróforo donador al fluoróforo aceptor. C) Unión de la enzima ADN polimerasa y elongación de la cadena. D) Las sondas no son hidrolizadas por la enzima y tras la elongación quedan libres para un nuevo ciclo de amplificación.

Como las sondas son específicas de la región a amplificar y complementarias a la misma, el aumento en la cantidad de fluorescencia medida en la longitud de onda de emisión del aceptor es proporcional al aumento en la cantidad de ADN generado (amplicones). La fluorescencia depende de la hibridación de ambos oligonucleótidos, por lo que la medición de fluorescencia se realiza en la etapa de anillamiento del ciclo de PCR. Por lo tanto, este sistema nos permite cuantificar a tiempo real la cantidad de producto amplificado. Además, puesto que las sondas no se hidrolizan, su fluorescencia es reversible y permite la generación de curvas de fusión.

El análisis de las curvas de fusión se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente al final de los ciclos de amplificación para monitorizar la cinética de disociación de los amplicones. La temperatura de fusión o *melting* ( $T_m$ ) es aquella a la cual la doble hélice de ADN se separa. Esta temperatura va a depender del contenido de bases y la longitud del amplicón. La sonda es complementaria a uno de los alelos (*wild-type* o mutado), siendo la  $T_m$  mayor cuanto mayor sea la compatibilidad entre la secuencia de ADN y la sonda. Esta diferencia en la  $T_m$  de los híbridos nos permitirá el genotipado de las muestras, pudiendo detectar individuos homocigotos *wild-type*, heterocigotos y homocigotos mutados (figura 26).



**Figura 26.** Ejemplo de genotipado mediante curvas (a) y picos de fusión (b).

### III. Materiales y métodos

Los polimorfismos *CYP2C19*\*2 y \*3 se analizaron usando LightMix® kit *CYP2C19*\*2 and *CYP2C19*\*3 (Cat.-No. 40-0304-32), y el polimorfismo *CYP2C19*\*17 con el kit LightSNiP rs12248560 *CYP2C19*\*17 de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania), de acuerdo a las instrucciones del fabricante (TIB MOLBIOL, GmbH, Berlin, Alemania).

Los reactivos utilizados fueron:

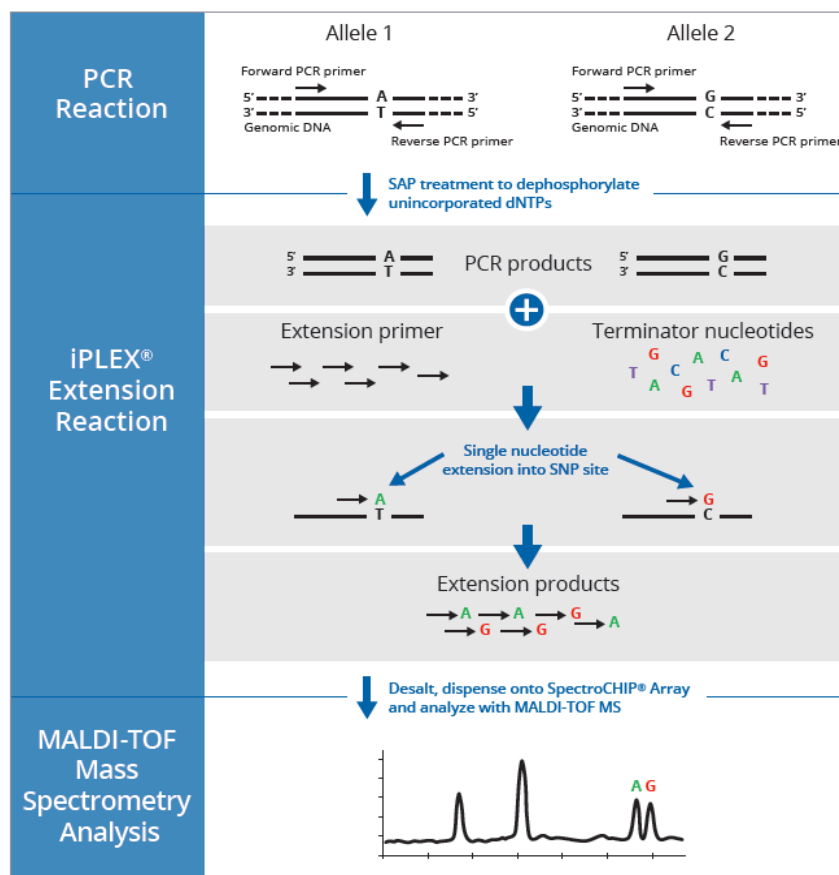
- ❖ LightMix® kit *CYP2C19*\*2 and *CYP2C19*\*3: 1,6 µl MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de reactivo LightMix que contiene cebadores y sondas premezcladas específicos de cada variante, 2 µl of FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics Shannon Co. Clare, Irlanda), 7,4 µl de H<sub>2</sub>O y 7 µl de ADN genómico (con una concentración en un rango entre 40 y 80 ng/µl).
- ❖ LightSNiP rs12248560 *CYP2C19*\*17: 1,6 µl MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de reactivo LightSNiP contiene cebadores y sondas premezcladas específicos de la variante, 2 µl of FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics Shannon Co. Clare, Irlanda), 8,4 µl de H<sub>2</sub>O y 7 µl de ADN genómico (con una concentración en un rango entre 40 y 80 ng/µl).

Todas las reacciones se llevaron a cabo con un control positivo y un control negativo. Para las variantes *CYP2C19*\*2 y \*3, las amplificaciones se realizaron con una etapa de desnaturalización inicial de 95°C durante 10 minutos; 45 ciclos de 95°C durante 5 s, 60°C durante 10 s, y 72°C durante 15 s; y una curva de fusión (95°C durante 20 s, 40°C durante 20 s, y 85°C durante 0 min). El alelo *CYP2C19*\*2 fue detectado en el canal 530 y el alelo \*3 en el canal 640 del equipo LightCycler 2.0; para ello fue necesario el uso del modo “compensación de color” CC 530-640, Cat.-No 05 997 704 001.

La variante *CYP2C19*\*17 se determinó mediante las siguientes condiciones de amplificación: una etapa de desnaturalización inicial de 95°C durante 10 min; 45 ciclos de 95°C durante 10 s, 60°C durante 10 s, y 72°C durante 15 s; y una curva de fusión (95°C durante 20 s, 40°C durante 20 s, y 85°C durante 0 min). El resultado del genotipado se analizó con el programa LightCycler® Software 4.1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

### 3.4. Genotipado mediante sistema MassARRAY

De las 144 muestras genotipadas para *CYP2C19*, sólo 140 estaban disponibles para el genotipado del resto de polimorfismos, puesto que 4 muestras se habían agotado y no fue posible recuperarlas. Las muestras fueron enviadas al Centro Nacional de Genotipado (CEGEN), nodo de Santiago de Compostela, para su análisis mediante la plataforma de Agena Bioscience MassARRAY®. Este sistema conlleva varios pasos (figura 27) mediante los cuales se consigue un genotipado preciso.



**Figura 27.** Flujo de trabajo con la plataforma MassARRAY.

El primero de ellos es la amplificación de nuestras regiones de interés mediante PCR. Para ello, los cebadores de PCR y de extensión se diseñaron con el software *Assay Design Suite* (ADS) (Agena Bioscience, San Diego, CA, EE. UU.). Dependiendo de la complejidad del diseño, cada reacción puede contener hasta 40 marcadores diferentes; generalmente, entre 24 y 36 ensayos se analizan a la vez en cada reacción <sup>141</sup>. Una vez

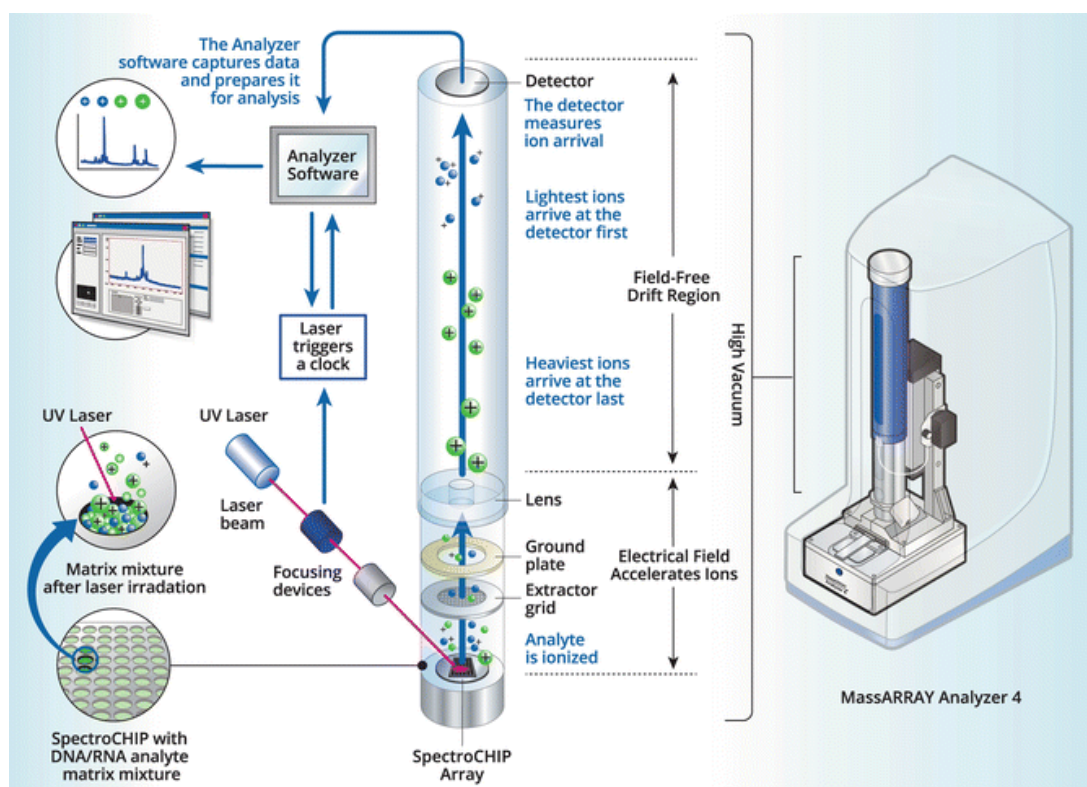
### III. Materiales y métodos

diseñados y adquiridos tanto los cebadores de amplificación como los de extensión, el ADN se amplifica utilizando los reactivos del kit iPLEX reagents. Los cebadores de PCR para cada ensayo dentro de la PCR multiplex se mezclan con Taq Master Mix que contiene tampones,  $MgCl_2$  y dNTPS. Además, se añaden 5-10 ng de ADN. Cada cebador de PCR contiene una cola no modificada de 10 pb que aumenta la masa del cebador, de modo que el cebador no extendido tenga una masa mayor que la del producto de extensión, y, por lo tanto, no interfiera con el análisis de genotipado <sup>141</sup>. Una vez finalizada la PCR, después de 45 ciclos de amplificación, el exceso de nucleótidos es eliminado mediante defosforilación alcalina (tratamiento SAP; *shrimp alkaline phosphatase*).

El siguiente paso del protocolo consiste en la extensión de un solo nucleótido. Es decir, los cebadores de extensión prediseñados reconocen la zona adyacente al SNP y una polimerasa modificada añade los oligonucleótidos que corresponden al SNP, dando como resultado una diferencia de masa específica de alelo entre productos de extensión. Esta diferencia de masa permite que el software de análisis de datos diferencie entre los alelos del SNP. Los productos extendidos (analitos) se desalan utilizando una resina y se transfieren de forma robotizada a un SpectroCHIP, un chip de silicio con una matriz de cristal predispensada. Posteriormente, el SpectroCHIP se coloca en el espectrómetro de masas y el genotipo se determina en tiempo real (figura 28).

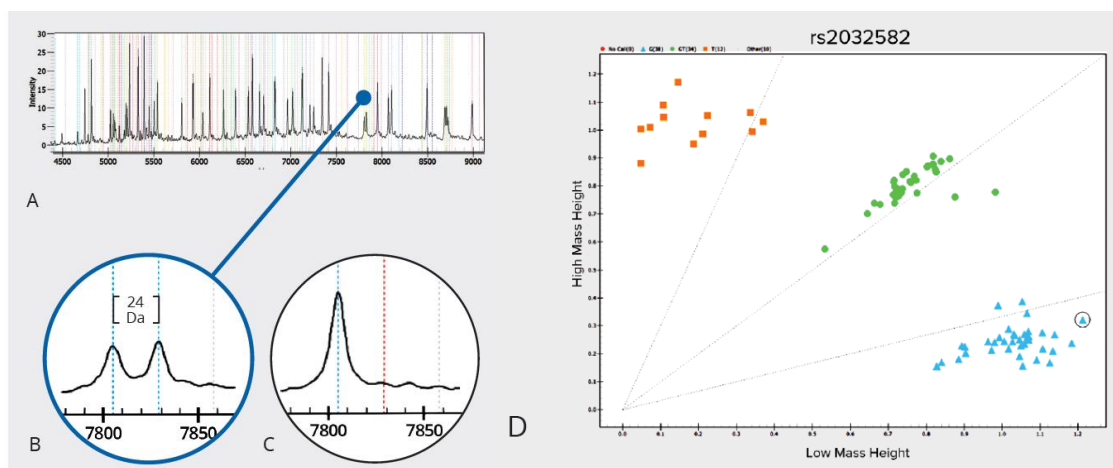
Para ello, se usa una tecnología basada en espectrometría de masas MALDI-TOF (del inglés *matrix-assisted laser desorption/ionization—time of flight*). El principio general de la espectrometría de masas es producir, separar y detectar iones en fase gaseosa. Sin embargo, moléculas más grandes, como ácidos nucleicos, resultan fragmentadas en las condiciones estándar de ionización. Las técnicas de ionización ligera resolvieron este problema mediante el uso de una matriz que absorbe mucha de esa energía que se aplica a la muestra, previniendo así la degradación <sup>141</sup>. En la espectrometría de masas MALDI-TOF para ácidos nucleicos, la muestra se aloja en una estructura

cristalina de pequeños compuestos orgánicos (ácido 3-hidroxipicolínico) y es depositada en una placa de metal como soporte conductivo <sup>141</sup>. Estos cristales son irradiados con un láser ultravioleta a una longitud de onda de 337 nm. Esta energía causa una descomposición estructural de los cristales y genera una nube de partículas donde los iones son extraídos por un campo eléctrico. Después de su aceleración a través del campo eléctrico, los iones se desplazan a través de una región libre de campo, donde los iones se desplazan a una velocidad inversamente proporcional a la raíz cuadrada de su masa/carga ( $m/z$ ), y finalmente llegan al detector. Las masas de los iones se calculan midiendo su TOF (*time-of-flight*), que será mayor para las moléculas más grandes y menor para las más pequeñas (figura 28).



**Figura 28.** Proceso de MALDI-TOF en MassARRAY.

Finalmente, mediante el uso del programa MassARRAY Typer Analyzer v4.0.20 (Agena Bioscience, San Diego, CA, EE. UU.) se evalúan los resultados del espectro (figura 29) y mediante la aplicación de análisis de *cluster*, se generan los informes de genotipado.

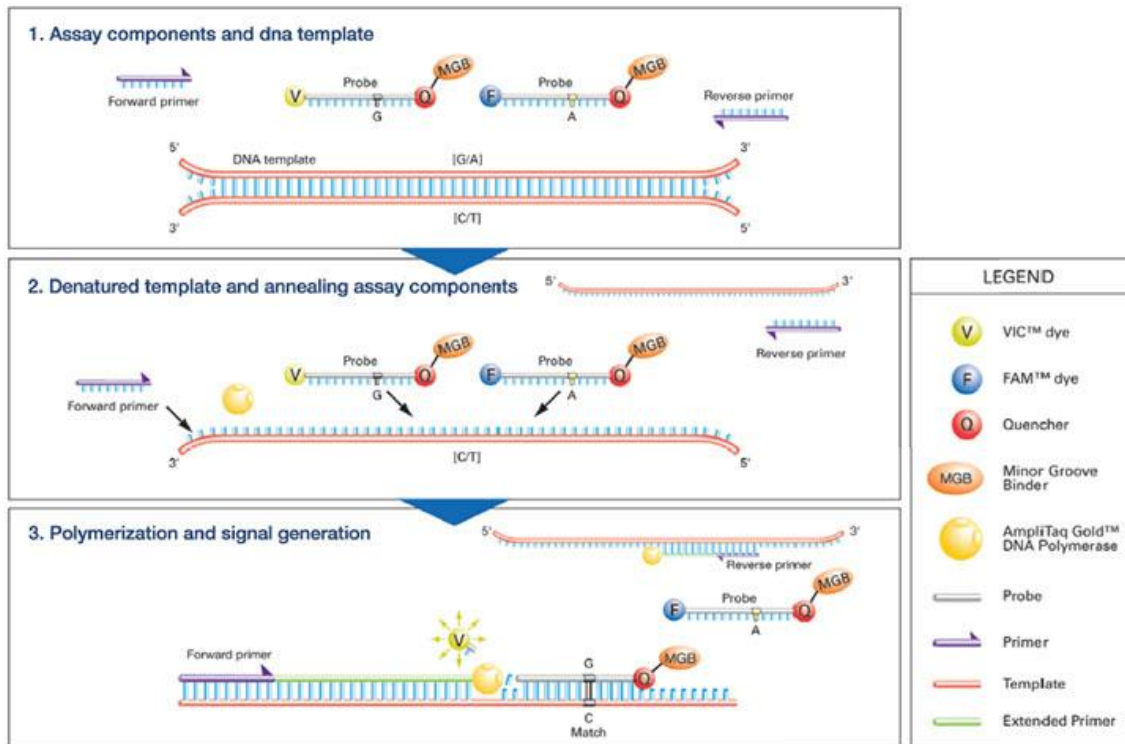


**Figura 29.** Ejemplo de resultado de genotipado con MassARRAY Typer Analyzer. El espectro (A) muestra un único ensayo de 36 reacciones. Los picos resaltados (B) indican la separación de 24 Da en alelos heterocigotos del SNP en cuestión, en comparación con el genotipo homocigótico con un pico único (C) del mismo SNP. El gráfico de agrupamiento (D) muestra los genotipos de todas las muestras analizadas.

### 3.5. Genotipado mediante sondas TaqMan

Algunos polimorfismos no se pudieron analizar mediante el sistema MassArray por la imposibilidad de su diseño. Por tanto, los polimorfismos *CYP1A2*\*1C (rs2069514), *CYP2B6*\*9 (rs3745274) y *PON1* (rs705379) se analizaron mediante qPCR en el equipo StepOne™ (Applied Biosystems, CA, USA). Para ello, se usaron los ensayos TaqMan (Applied Biosystems, CA, USA). Este tipo de ensayos se basan en la utilización de dos sondas de discriminación que distinguen entre los dos posibles alelos de un SNP, portando cada una de ellas uno de los dos posibles alelos complementarios a la hebra madre. Cada una de las dos sondas tiene en su extremo 5' un fluorocromo diferente (VIC o FAM) y en su extremo 3' un “apantallador de fluorescencia” o *quencher*, que bloquea la emisión de fluorescencia por su proximidad con el fluorocromo. En el momento de la hibridación específica de la sonda y durante la fase de extensión gracias a la actividad de la ADN polimerasa, se separará el *quencher* del fluorocromo (VIC o FAM), pudiendo así este dar lugar a la emisión de fluorescencia (figura 30).

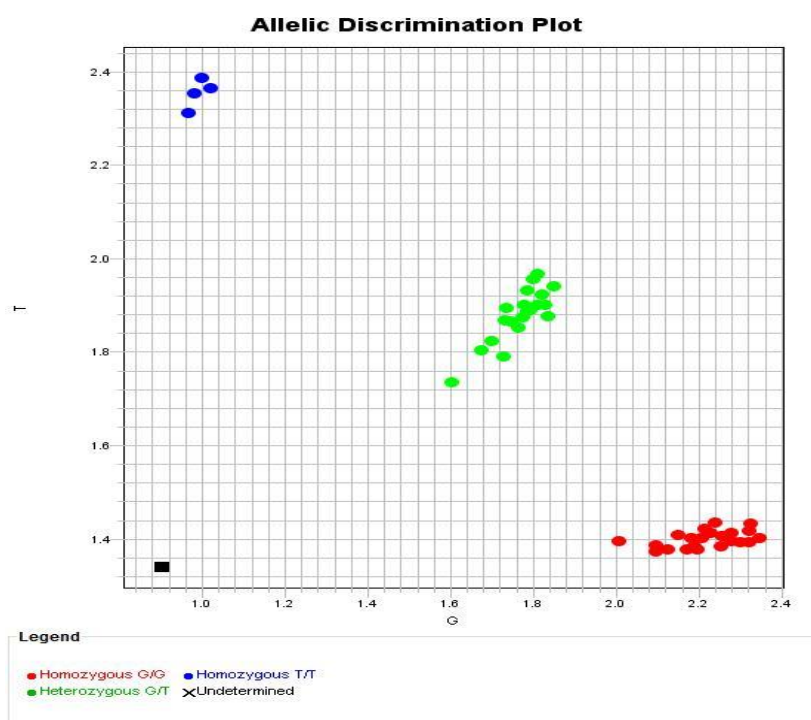




**Figura 30.** Esquema de una qPCR con los ensayos TaqMan

Esta señal de fluorescencia es recogida por el equipo y el software de análisis nos permite analizar los datos en un gráfico de discriminación alélica (ver figura 31), donde aquellas muestras en las que la señal de fluorescencia se deba únicamente a VIC aparecerán en la parte inferior derecha, como portadoras en homocigosis del alelo 1 (en la figura 31 alelo “G”); mientras que las muestras que sólo hayan emitido señal del fluoróforo FAM aparecerán en la parte superior izquierda, como portadoras en homocigosis del alelo 2 (en la figura 31 alelo “T”). Aquellas muestras que sean heterocigotas (portadores del genotipo G/T) aparecerán en el medio del gráfico, puesto que han emitido señal de ambos fluoróforos.





**Figura 31.** Ejemplo de gráfico de discriminación alélica

#### 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el software SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois), considerando estadísticamente significativos valores de p inferiores a 0,05.

##### 4.1. Análisis estadístico de los polimorfismos genéticos

Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de todos los polimorfismos y se comprobó que estuvieran en equilibrio de Hardy-Weinberg mediante una prueba exacta de Fisher con el programa De Finetti (disponible en <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Este principio aplicado en genética de poblaciones postula que en una población de gran tamaño, donde los individuos se aparean al azar y que no está sometida a mutación, selección o migración, el proceso de la herencia, por sí mismo, no cambia las frecuencias alélicas ni genotípicas de una generación a otra, una vez se haya alcanzado el estado de equilibrio <sup>142,143</sup>. Una desviación en el equilibrio de Hardy-Weinberg puede deberse a un sesgo en el genotipado, relaciones de parentesco o

consanguinidad entre los individuos <sup>144</sup> o en el caso de estar valorando una enfermedad que esté asociada a ese gen/polimorfismo. Se considera que un polimorfismo está en equilibrio de Hardy-Weinberg si el valor  $p > 0,05$ .

Para simplificar el análisis, los genotipos se clasificaron de acuerdo a las definiciones alélicas del CPIC <sup>87</sup> y las tablas de funcionalidad alélicas, como la previamente descrita por nuestro grupo para *CYP1A2* <sup>145</sup>. Así, los genotipos de *CYP2C19* se clasificaron en base al número de alelos funcionales en: PM (\*2/\*2), IM (\*1/\*2 y \*2/\*17), NM (\*1/\*1), RM (\*1/\*17) y UM (\*17/\*17) <sup>87</sup>; posteriormente se agruparon los pacientes con fenotipo IM-PM y RM-UM para el análisis estadístico. Además, los genotipos de *CYP2B6*, *CYP2C8* y *CYP2C9* también se clasificaron en PM (portadores de dos alelos mutados), IM (portadores de *CYP2B6* \*5 o \*9, *CYP2C8* \*2, \*3 o \*4 y *CYP2C9* \*2 o \*3 en heterocigosis), y NM (portadores del genotipo \*1/\*1) de acuerdo a la funcionalidad de los alelos. Los alelos de *CYP1A2* \*1C, \*1, \*1B y \*1F recibieron una puntuación de actividad de 0.5, 1, 1.25 y 1.5, respectivamente. Por lo tanto, como se validó previamente <sup>145</sup>, los pacientes con *CYP1A2* \*1/\*1B, \*1/\*1F, \*1B/\*1B, \*1C/\*1F, \*1C/\*1B se categorizaron en el fenotipo *CYP1A2* NM/RM. Además, a los pacientes con genotipos *CYP1A2* \*1B/\*1F y \*1F/\*1F se les asignó un fenotipo UM. El único paciente con el genotipo *CYP1A2* \*1C/\*1C se clasificó como PM. Igualmente, los pacientes con *CYP3A4* \*1/\*1 se clasificaron como NM y los pacientes portadores de los genotipos *CYP3A4* \*1/\*22 y \*22/\*22 se clasificaron como IM-PM. Del mismo modo, los pacientes con genotipos *CYP3A5* \*1/\*3 y \*1/\*6 se clasificaron como "expresores" y los pacientes portadores de los genotipos *CYP3A5* \*3/\*3 y \*3/\*6 como "no expresores". Con respecto a *PON1*, como no hay una tabla de funcionalidad que permita inferir un fenotipo, asignamos el fenotipo NM a aquellos pacientes sin ninguna mutación. Por el contrario, los portadores de un alelo mutado en cualquiera de las tres variantes analizadas (rs662, rs854560 y rs705379) se consideraron IM. Los portadores de dos alelos mutados en cualquiera de las tres variantes de *PON1* se consideraron PM. Finalmente, los genotipos *ABCB1* C3435T, C1236T y G2677T/A se clasificaron en un

haplotipo "de tipo salvaje" o *wild-type* cuando hubo una ausencia de mutación, "heterocigoto" cuando hubo cualquier genotipo heterocigoto en al menos una de las tres variantes y "mutado" cuando había dos alelos mutados en cualquiera de los tres polimorfismos.

#### 4.2. Análisis estadístico de las características demográficas y clínicas previas al tratamiento con clopidogrel

Se realizó un análisis descriptivo y de frecuencias de las principales características demográficas y clínicas previas al tratamiento con clopidogrel, comparándolas entre sexos mediante la prueba Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). Además, se analizó la asociación entre estas variables demográficas y clínicas y las frecuencias genotípicas y fenotípicas mediante  $\chi^2$ .

Se usaron los residuos tipificados corregidos de Haberman <sup>146</sup> para estudiar el número de casos con eventos isquémicos y hemorrágicos entre los distintos fenotipos de CYP2C19, mediante tablas de contingencia. Los residuos se distribuyen con media 0 y desviación típica 1. Usando un nivel de confianza de 0,95, se considera que los residuos mayores de 1,96 delatan casillas con más casos de los que cabría esperar en esa casilla, bajo la hipótesis de independencia entre las variables; mientras que residuos menores a -1,96 delatan casillas con menos casos de los esperables, también bajo la hipótesis de independencia entre variables.

#### 4.3. Análisis estadístico de las características clínicas durante el tratamiento con clopidogrel

Se realizó un análisis descriptivo y de frecuencias de los parámetros de respuesta al tratamiento con clopidogrel. La relación entre las variables cualitativas (pacientes respondedores, pacientes que requirieron reducción de dosis o cambio de tratamiento, pacientes con eventos isquémicos y hemorrágicos) y el sexo o el genotipo se estableció mediante  $\chi^2$ . Las variables cuantitativas (valor de agregometría y duración del

tratamiento) se compararon entre sexos, entre pacientes con y sin eventos clínicos y los diferentes genotipos mediante un análisis univariante paramétrico (T-test o ANOVA).

Posteriormente, se realizó un análisis de regresión múltiple para analizar el efecto sobre el valor de agregometría (mediante regresión lineal) y la incidencia de eventos posteriores isquémicos y hemorrágicos (mediante regresión logística). En estos análisis multivariantes se incluyeron todas aquellas variables demográficas y clínicas relevantes para el desenlace, así como los diferentes genotipos (Tabla 6). Todas aquellas variables cualitativas con más de dos categorías se analizaron usando variables *dummy*. Para conocer el porcentaje de varianza que explica cada una de las variables independientes en el modelo de regresión lineal se usaron las correlaciones semiparciales.

**Tabla 6.** Análisis multivariante mediante regresión lineal y regresión logística

Variable dependiente				
Variables independientes	Agregometría (R. Lin)	Tiempo de tto (R. Lin)	Incidencia de eventos IQ (R.Log)	Incidencia de eventos HM (R.Log)
	Sexo	Sexo	Sexo	Sexo
	Tipo de intervención	Agregometría	Agregometría	Agregometría
	Tiempo de tto	Tipo de intervención	Tipo de intervención	Tipo de intervención
	Tto concomitante	Tto concomitante	Eventos IQ previos	Eventos HM previos
	Fact. de riesgo CV	Fact. de riesgo CV	Tiempo de tto	Tiempo de tto
	Eventos IQ previos	Eventos IQ previos	Tto concomitante	Tto concomitante
	Eventos HM previos	Eventos HM previos	Fact. de riesgo CV	Fact. de riesgo CV
	Genotipos	Genotipos	Genotipos	Genotipos

Abreviaturas: R. Lin, regresión lineal; R. Log, regresión logística; tto, tratamiento; Fact. de riesgo CV, factores de riesgo cardiovascular; IQ, isquémico; HM, hemorrágico.

El tiempo hasta la aparición de un evento isquémico o hemorrágico se ha estudiado mediante el análisis de supervivencia con el procedimiento de Kaplan-Meier, y las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba Log-rank. Los pacientes fueron censurados cuando el tratamiento con clopidogrel o el seguimiento se terminaron.

## 5. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El estudio fue enviado a la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) para su clasificación, quien resolvió clasificándolo como un estudio posautorización con otros diseños diferentes al de seguimiento prospectivo, por lo que para el inicio del estudio sólo se necesitó la aprobación de un Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos (CEIm) acreditado.

Este estudio fue evaluado y aprobado el 18 de abril de 2018 por el CEIm del Hospital Universitario de la Princesa (código SFC-CLO-2018, nº de registro 3392). Todos los procedimientos se realizaron bajo las normas de buena práctica clínica y de acuerdo a los principios establecidos en la Declaración de Helsinki <sup>147</sup>. No fue necesaria la firma de un consentimiento informado para el genotipado de *CYP2C19* puesto que se trata de un procedimiento asistencial. Además, La LEY 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica, recoge que de forma excepcional podrán tratarse muestras codificadas o identificadas con fines de investigación biomédica sin el consentimiento del sujeto, cuando la obtención de dicho consentimiento no sea posible o represente un esfuerzo no razonable. Estos casos incluyen estudios, que, como el nuestro:

- ❖ Se traten de una investigación de interés general.

Este estudio representa el primero en valorar varios genes implicados en el metabolismo y mecanismo de acción de clopidogrel, un fármaco ampliamente utilizado en los procesos de neurointervencionismo.

- ❖ Que la investigación se lleve a cabo por la misma institución que solicitó el consentimiento para la obtención de las muestras.

La investigación se realizó por los mismos investigadores del Servicio de Farmacología Clínica y el Servicio de Radiología Intervencionista del Hospital Universitario de la Princesa que realizaron el análisis de *CYP2C19* como labor asistencial.

- ❖ Que la investigación sea menos efectiva o no sea posible sin los datos identificativos del sujeto fuente.

Para este estudio fue necesario utilizar los datos codificados para poder correlacionar los polimorfismos genéticos con la evolución clínica del paciente.

- ❖ Que no conste una objeción expresa del mismo.

No consta una objeción expresa al estudio por parte de ninguno de los pacientes.

- ❖ Que se garantice la confidencialidad de los datos de carácter personal.

Los datos de filiación fueron protegidos mediante la asignación a cada historia clínica de un número que quedó registrado y guardado en un fichero al que nadie ajeno al estudio tuvo acceso. De este modo sólo se trabajó con datos clínicos codificados y se mantuvo en todo momento la confidencialidad de los pacientes incluidos en el estudio.

En base a estos argumentos el CEIm aprobó la realización del proyecto de investigación sin la solicitud del consentimiento de los pacientes.



## **IV. RESULTADOS**

En relación con los resultados de este apartado se han publicado los siguientes artículos, incluidos en el anexo I:

❖ **Influence of CYP2C19 Phenotype on the Effect of Clopidogrel in Patients Undergoing a Percutaneous Neurointervention Procedure.**

Saiz-Rodríguez M, Romero-Palacián D, Villalobos-Vilda C, Caniego JL, Belmonte C, Koller D, Bárcena E, Talegón M, Abad-Santos F.

Clin Pharmacol Ther. 2019 Mar;105(3):661-671. DOI:10.1002/cpt.1067. Epub 2018 Apr 17. PMID: 29536505

Factor de impacto: 6,544 (D1)

❖ **CYP2C19 ultra-rapid phenotype as a risk predictor of subsequent events during clopidogrel treatment in patients undergoing a percutaneous neurointervention.** (Letter to the Editor).

Saiz-Rodríguez M, Belmonte C, Abad-Santos F.

Clin Pharmacol Ther. 2019 May;105(5):1074-1075. DOI: 10.1002/cpt.1300. Epub 2019 Jan 16. PMID: 30652301

Factor de impacto: 6,544 (D1)

❖ **Influence of CYP450 enzymes, CES1, PON1, ABCB1 and P2RY12 polymorphisms on clopidogrel response in patients subjected to a percutaneous neurointervention**

Saiz-Rodríguez M, Belmonte C, Caniego JL, Koller D, Zubiaur P, Bárcena E, Romero-Palacián D, Eugene AR, Ochoa D, Abad-Santos F.

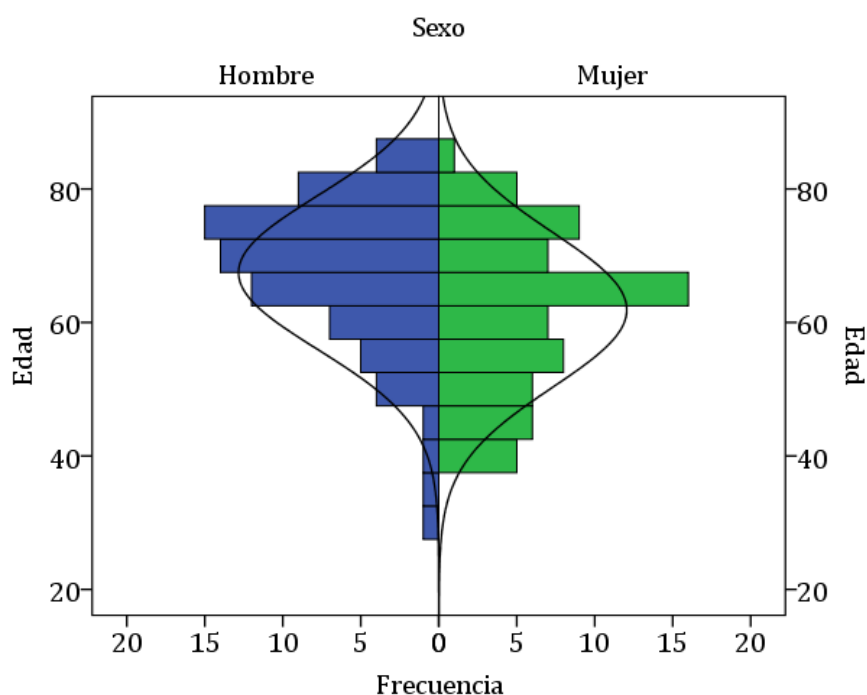
Clin Ther. 2019. Aceptado.

Factor de impacto: 3,185 (Q2)



## 1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS

Para el estudio se incluyeron 144 pacientes <sup>D</sup> (74 hombres y 70 mujeres) derivados desde el Servicio de Radiología Intervencionista del Hospital Universitario de La Princesa. La edad media de los pacientes fue de 64 años, siendo significativamente mayor en los hombres ( $67,5 \pm 11,5$  años) que en las mujeres ( $61,9 \pm 11,6$  años),  $p=0,004$ . En la figura 32 se muestra la pirámide poblacional de los pacientes incluidos.



**Figura 32.** Pirámide poblacional de nuestra población de estudio

La tabla 7 muestra las principales características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio. Es destacable que alrededor del 90% de los pacientes presentaban algún factor de riesgo cardiovascular (FRCV), siendo los más prevalentes hipertensión (63,2%), dislipemia (48,6%), ser fumador (32,6%) y diabetes mellitus (19,4%). En general, los hombres presentaban más factores de riesgo, aunque sólo fue significativo para la dislipemia.

<sup>D</sup> Cabe señalar que en la primera publicación de la presente Tesis Doctoral (Saiz-Rodríguez M *et al.* Clin Pharmacol Ther. 2019 Mar;105(3):661-671), realizada hace un año, sólo estaban incluidos 123 de los 144 pacientes actuales.

**Tabla 7.** Características clínicas de los pacientes

	Todos (N=144)	Hombres (n=74)	Mujeres (n=70)	Valor P
<b>Factores de riesgo cardiovascular</b>	129 (89,6)	70 (94,6)	59 (84,3)	0,056
Hipertensión	91 (63,2)	52 (70,3)	39 (55,7)	0,085
Dislipemia	70 (48,6)	44 (59,5)	26 (37,1)	<b>0,008</b>
Obesidad	3 (2,1)	1 (1,4)	2 (2,9)	0,612
Fibrilación auricular	3 (2,1)	3 (4,1)	0 (0)	0,245
Diabetes mellitus	28 (19,4)	19 (25,7)	9 (12,9)	0,060
Fumador	47 (32,6)	28 (37,8)	19 (27,1)	0,214
<b>Eventos isquémicos y hemorrágicos previos</b>	52 (36,1) *	34 (45,9)	18 (25,7)	<b>0,015</b>
Infarto agudo de miocardio	9 (6,3)	8 (10,8)	1 (1,4)	<b>0,034</b>
Accidente isquémico transitorio	16 (11,1)	15 (20,3)	1 (1,4)	<b>&lt;0,001</b>
Ictus isquémico	20 (13,9)	14 (18,9)	6 (8,6)	0,093
Ictus hemorrágico	11 (7,6)	1 (1,4)	10 (14,3)	<b>0,004</b>
<b>Pacientes con tratamiento concomitante</b>	141 (97,9)	73 (98,6)	68 (97,1)	0,612
Anticoagulantes orales	4 (2,8)	4 (5,4)	0 (0)	0,120
Ácido acetilsalicílico	139 (96,5)	73 (98,6)	66 (94,3)	0,200
Heparina	1 (0,7)	1 (1,4)	0 (0)	1,000
AINE	7 (4,9)	2 (2,7)	5 (7,1)	0,266
IBP	110 (76,4)	56 (75,7)	54 (77,1)	0,847
ISRS	11 (7,6)	2 (2,7)	9 (12,9)	<b>0,028</b>

Los valores se muestran como n° de pacientes (%). \*Un paciente presentó antecedentes de infarto agudo de miocardio, accidente isquémico transitorio e ictus isquémico. Dos pacientes presentaron accidente isquémico transitorio e ictus isquémico. Abreviaturas: AINE, antiinflamatorios no esteroideos; IBP, inhibidores de la bomba de protones; ISRS, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina.

En cuanto a la prevalencia de eventos isquémicos y/o hemorrágicos previos, observamos que el 36,1% de los pacientes habían sufrido algún tipo de evento previo a la intervención, siendo el más frecuente el ictus hemorrágico (13,9%), seguido de accidente isquémico transitorio (11,1%). Los hombres presentaron una mayor incidencia de infarto agudo de miocardio (10,8% vs. 1,4% en mujeres), accidente isquémico transitorio (20,3% vs. 1,4% en mujeres) e ictus isquémico (18,9% vs. 8.6%

#### IV. Resultados

en mujeres) mientras que las mujeres una mayor incidencia de ictus hemorrágico (14,3% vs. 1,4% en hombres).

La gran mayoría de pacientes (97,9%) estaban recibiendo tratamiento concomitante, siendo el más frecuente la antiagregación con ácido acetilsalicílico (96%). Además, el 76% de los pacientes estaban tomando IBP (el 50% tomaban omeprazol y el otro 50% pantoprazol), los cuales son metabolizados a través de la enzima CYP2C19 y pueden inhibir esta enzima. El consumo de ISRS fue más frecuente en mujeres, fármacos que también pueden interaccionar con CYP2C19.

## 2. TRATAMIENTO NEUROINTERVENCIONISTA

Como se refleja en la tabla 8, el 46,5% de los pacientes fueron intervenidos por la presencia de un aneurisma, manifestándose la rotura de 3 de ellos (2,1%) en una HSA. El 53,5% fueron intervenidos por una estenosis, manifestándose esta en un 6,9% en AIT y en un 27,8% en un infarto cerebral. En este sentido, los aneurismas eran más frecuentemente hallados en mujeres (75,7%) que en hombres (18,9%),  $p<0,001$ ; mientras que las estenosis eran más frecuentemente detectadas en hombres (81,1%) en comparación con las mujeres (24,3%),  $p<0,001$ .

El tipo de intervención más frecuentemente practicado fue la aplicación de stent en un 66,7%, frente a un 22,9% de uso de derivadores de flujo y un 8,3% de aplicación de coils. En un 2,1% de los pacientes no se aplicó un stent o coils durante el tratamiento con clopidogrel (en un paciente por imposibilidad técnica, en otro paciente por una hemorragia durante la angioplastia y en otro paciente porque se cambió el tratamiento a ticagrelor antes de la intervención, por lo que se interrumpió el seguimiento con clopidogrel). La tabla 8 muestra el número de pacientes tratados con cada tipo de intervención en cuanto al sexo, pudiéndose observar que los pacientes tratados con stents fueron mayoritariamente hombres, mientras que los pacientes tratados con derivador de flujo y coils fueron en su mayoría mujeres.

**Tabla 8.** Tipo de intervenciones realizadas de acuerdo con el sexo

Motivo de la intervención	Todos (N=144)	Hombres (n=74)	Mujeres (n=70)	Valor P
Aneurisma	67 (46,5)	14 (18,9)	53 (75,7)	<b>&lt;0,001</b>
Estenosis	77 (53,5)	60 (81,1)	17 (24,3)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Tipo de intervención</b>				
Derivador de flujo	33 (22,9)	7 (9,5)	26 (37,1)	<b>&lt;0,001</b>
Aplicación de stent	96 (66,7)	63 (85,1)	33 (47,1)	
Aplicación de coils	12 (8,3)	2 (2,7)	10 (14,3)	
No aplicación de stent/coils	3 (2,1)	2 (2,7)	1 (1,4)	

Los valores se muestran como n° de pacientes (%).

### 3. DESENLACE CLÍNICO DE LOS PACIENTES

En la tabla 9 se muestran las principales características del desenlace clínico de los pacientes después de comenzar el tratamiento con clopidogrel.

**Tabla 9.** Desenlace clínico de los pacientes de acuerdo con el sexo

	Todos (N=144)	Hombres (n=74)	Mujeres (n=70)	Valor P
<b>Agregometría, PRU (n=141)</b>	161,3± 87,3	173,8± 86,0	148,1 ± 87,3	0,081
<b>Respondedores (n=141) *</b>	79 (56,0)	35 (48,6)	44 (63,8)	0,090
<b>Reducción de dosis</b>	7 (4,9)	1 (1,4)	6 (8,6)	0,058
<b>Cambio de tratamiento</b>	20 (13,9)	7 (9,5)	13 (8,6)	0,149
<b>Duración del tratamiento**</b>	82,5 (1-3079)	80 (1-3079)	82,5(1-2367)	0,826

Los valores se muestran como media ± DS para la agregometría, mediana (rango) para la duración del tratamiento o n (%) para el resto. Abreviaturas: PRU, unidad de reacción P2Y12. \*Los pacientes se consideraron respondedores cuando los valores PRU estaban por debajo de 180. \*\* La duración del tratamiento se expresa en días.

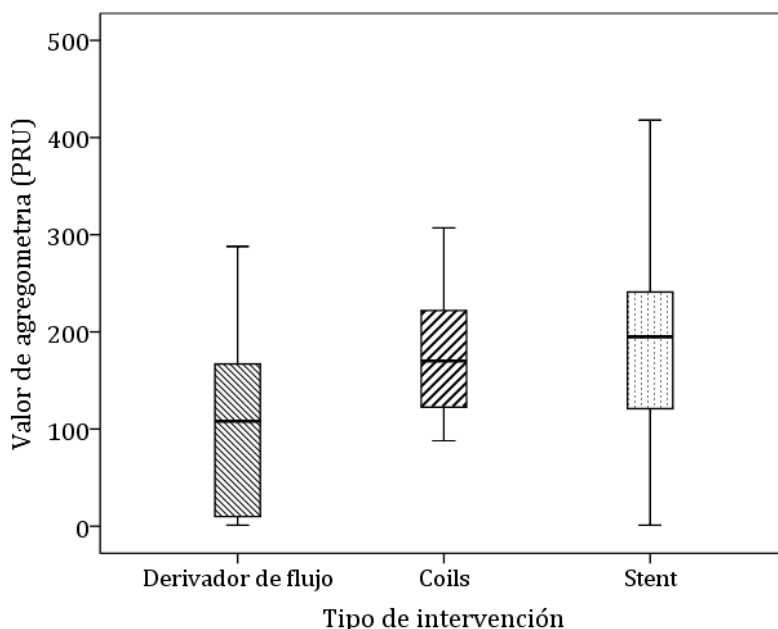
#### 3.1. Efecto sobre la agregación plaquetaria

Nótese que el valor de agregometría y, por tanto, la valoración de pacientes respondedores, sólo se pudo recoger en 141 pacientes, puesto que en tres de los pacientes no fue posible realizar el procedimiento con el equipo VerifyNow.

#### IV. Resultados

El valor medio de agregometría se situó en  $161,3 \pm 87,3$  PRU, lo que indica que la mayoría consigue una buena respuesta al tratamiento con clopidogrel, por situarse por debajo de 180 PRU. Aunque no fue estadísticamente significativo, se observó que los hombres tenían una peor respuesta antiplaquetaria que las mujeres, aunque esta siguió siendo menor a 180 PRU (tabla 9). De acuerdo al valor de agregometría dividimos a los pacientes en respondedores ( $\text{PRU} < 180$ ) o no respondedores ( $\text{PRU} \geq 180$ ). El 56% de los pacientes fueron buenos respondedores a clopidogrel, siendo este porcentaje mayor en las mujeres (64%) que en los hombres (49%), aunque esta diferencia no alcanzó la significación estadística.

El valor de agregometría difirió significativamente según el tipo de intervención al que eran sometidos los pacientes, siendo significativamente menor en la aplicación de un derivador de flujo ( $101,7 \pm 84,4$  PRU) que en el caso de la aplicación de coils ( $179,2 \pm 71,7$  PRU) o de un stent ( $180,9 \pm 81,2$  PRU),  $p < 0,001$  (figura 33). Por tanto, esta variable se incluyó como variable de ajuste en los análisis posteriores.



**Figura 33.** Valor de agregometría en base al tipo de intervención realizada.

La parte inferior y superior del cuadro representan el primer y tercer cuartil, respectivamente. La banda dentro del cuadro corresponde al segundo cuartil (la mediana). Los bigotes se extienden a los valores máximo y mínimo de la serie o hasta 1,5 veces el rango intercuartílico.

Asimismo, se observó una diferencia en la duración del tratamiento en base al tipo de intervención realizada, siendo menor cuando se implantaban coils (mediana=80 y rango 1-195 días, media=48,4 ± 68,1 días), en contraste con el uso de derivadores de flujo (mediana=88 y rango 1-1256 días, media=140,1 ± 261,5 días) y la aplicación de stent (mediana=80 y rango 1-3079 días, media=375,4 ± 682,5 días),  $p=0,01$ .

Finalmente, ajustándose en base al valor de agregometría, el 5% de los pacientes necesitaron una reducción de la dosis y el 13,9% un cambio de tratamiento. Los pacientes que requirieron un cambio de tratamiento presentaban valores de agregometría significativamente superiores (223,8 ± 97,8 PRU vs. 150,9 ± 81,3 PRU en pacientes sin cambios de tratamiento),  $p<0,001$ ). Por el contrario, el valor de agregometría fue significativamente inferior en los pacientes en los que se redujo la dosis (25,4 ± 63,3 PRU vs. 168,3 ± 82,6 PRU en pacientes sin reducción de dosis),  $p<0,001$ .

De los 20 pacientes en los que se produjo un cambio de tratamiento, 18 (90%) recibieron ticagrelor y ácido acetilsalicílico, 1 (5%) prasugrel y ácido acetilsalicílico y 1 (5%) sólo ácido acetilsalicílico. Estos porcentajes no variaron significativamente entre hombres y mujeres, aunque se observó una tendencia a mayor porcentaje de reducción de dosis en las mujeres (8,6% vs. 1,4% en hombres;  $p=0,058$ ) (ver tabla 9).

En cuanto a la influencia de los factores de riesgo cardiovascular (tabla 10), observamos que la presencia de ciertos factores de riesgo como dislipemia, diabetes mellitus o haber padecido un AIT aumentaban significativamente el valor de agregometría, asociado a una peor respuesta. Por otro lado, el porcentaje de respondedores fue muy superior en los pacientes con ictus hemorrágico previo.

**Tabla 10.** Influencia de los factores de riesgo cardiovascular sobre el valor de agregometría y el porcentaje de pacientes respondedores a clopidogrel

<b>Factor de riesgo cardiovascular</b>	<b>Presencia</b>	<b>Valor de agregometría</b>	<b>Valor P*</b>	<b>% respondedores</b>	<b>Valor P**</b>
Hipertensión	No (n=52)	161,3 ± 85,5	0,995	55,8	1,000
	Si (n=89)	161,2 ± 88,8		56,2	
Dislipemia	No (n=72)	142,9 ± 96,0	<b>0,010</b>	63,9	0,063
	Si (n=69)	180,4 ± 73,0		47,8	
Obesidad	No (n=138)	160,0 ± 87,7	0,265	56,5	0,582
	Si (n=3)	217,0 ± 46,6		33,3	
Fibrilación auricular	No (n=138)	161,4 ± 86,9	0,854	55,8	1,000
	Si (n=3)	152,0 ± 124,0		66,7	
Diabetes mellitus	No (n=113)	150,7 ± 89,7	<b>0,001</b>	60,2	0,057
	Si (n=28)	203,6 ± 61,7		39,3	
Fumador	No (n=96)	161,7 ± 86,7	0,936	56,3	1,000
	Si (n=45)	160,4 ± 89,4		55,6	
Infarto agudo de miocardio	No (n=132)	160,8 ± 88,8	0,805	56,1	1,000
	Si (n=9)	168,2 ± 64,2		55,6	
Accidente isquémico transitorio	No (n=127)	156,8 ± 88,1	0,069	59,1	<b>0,045</b>
	Si (n=14)	201,5 ± 70,4		28,6	
Ictus isquémico	No (n=122)	156,5 ± 89,3	0,100	57,4	0,462
	Si (n=19)	191,9 ± 67,2		47,4	
Ictus hemorrágico	No (n=130)	165,5 ± 87,9	<b>0,044</b>	53,1	<b>0,023</b>
	Si (n=11)	110,5 ± 63,0		90,9	

\* Valor P del T-test: valor de agregometría comparado entre la presencia del factor de riesgo cardiovascular

\*\* Valor P de chi-cuadrado: pacientes respondedores vs. factor de riesgo cardiovascular

### 3.2. Incidencia de eventos isquémicos y hemorrágicos durante el tratamiento con clopidogrel

El 18,8% de los pacientes presentaron algún tipo de evento clínico durante el tratamiento con clopidogrel, siendo más frecuentes los eventos de tipo isquémico (10,4%) que los eventos hemorrágicos (9,0%). La tabla 11 muestra la influencia del valor de agregometría en la incidencia de eventos isquémicos y hemorrágicos.

De los pacientes respondedores, el 7,6% tuvieron algún evento isquémico durante el tratamiento con clopidogrel. Este porcentaje fue superior (14,5%) en los pacientes no respondedores, aunque no alcanzó la significación estadística ( $p=0,271$ ). La incidencia

de eventos hemorrágicos fue similar entre los respondedores (7,6%) y los no respondedores (6,5%),  $p=1,000$ .

**Tabla 11.** Comparación del valor de agregometría en los pacientes que tuvieron eventos isquémicos o hemorrágicos.

Tipo de evento	Valor de agregometría	Valor P
<b>Isquémico</b>		
Si (n=15)	158,3 ± 86,8	0,244
No (n=126)	186,1 ± 90,2	
<b>Hemorrágico</b>		
Si (n=10)	162,0 ± 87,4	0,699
No (n=131)	150,9 ± 89,1	

Durante los procedimientos neurointervencionistas, 4 pacientes (1 hombre y 3 mujeres) experimentaron una hemorragia debido a una perforación de una arteria. Estas hemorragias no se consideraron en el análisis, ya que no estaban relacionadas con el tratamiento con clopidogrel, sino con el procedimiento. En la tabla 12 se desglosan los detalles de la incidencia de eventos clínicos en la población de estudio y la comparación entre sexos, pudiéndose observar que no hubo diferencias significativas.

**Tabla 12.** Incidencia de eventos clínicos posteriores

Evento clínico posterior	Todos (N=144)	Hombre (n=74)	Mujeres (n=70)	Valor P
<b>Presencia de evento posterior</b>	27 (18,8)	15 (20,3)	12 (17,1)	0,674
<b>Total de eventos isquémicos</b>	15 (10,4)*	8 (10,8)	7 (10,0)	1,000
Accidente isquémico transitorio	3 (2,1)	2 (2,7)	1 (1,4)	1,000
Ictus isquémico	5 (3,5)	1 (1,4)	4 (5,7)	0,200
Re-estenosis del stent	8 (5,6)	6 (8,1)	2 (2,9)	0,277
<b>Total de eventos hemorrágicos</b>	13 (9,0)**	7 (9,5)	6 (8,6)	1,000
Ictus hemorrágico	4 (2,8)	2 (2,7)	2 (2,9)	1,000
Hemorragia subaracnoidea	1 (0,7)	0 (0)	1 (1,4)	0,480
Otras hemorragias	9 (6,3)	5 (6,8)	4 (5,7)	1,000

Los valores se muestran como n° de pacientes (%). \* Un paciente presentó accidente isquémico transitorio e ictus isquémico. \*\* Un paciente presentó hemorragia subaracnoidea e ictus hemorrágico.

Que el motivo de la intervención fuera un aneurisma no influyó en el desarrollo de eventos hemorrágicos posteriores, ya que la incidencia fue similar en aquellos que no tuvieron aneurisma (9,1%) y en los que sí (9%),  $p=1,000$ . Sin embargo, aunque no fue



significativo, los pacientes con estenosis tuvieron una mayor incidencia de eventos isquémicos (13,0%) que los que no presentaban estenosis (7,5%),  $p=0,413$ .

Durante el tratamiento con clopidogrel fallecieron 4 pacientes (2,8%). Uno de ellos falleció por una obstrucción intestinal, dos fallecieron tras un ictus hemorrágico y uno de ellos por una hemorragia durante la angioplastia (que no se consideró para el cómputo de eventos hemorrágicos por deberse al procedimiento y no al tratamiento con clopidogrel).

#### 4. INFLUENCIA DEL USO DE MEDICACION CONCOMITANTE

Como ya se ha mencionado previamente, el 97,9% de los pacientes estaban recibiendo tratamiento concomitante, predominantemente ácido acetilsalicílico (96,5%) e IBP (76,4%). El valor de agregometría fue significativamente superior en los pacientes que tomaban IBP ( $170,7 \pm 84,5$  PRU) frente a los que no los tomaban ( $129,0 \pm 90,2$  PRU),  $p=0,017$ . Por lo tanto, el tratamiento con IBP se consideró como variable de ajuste para el análisis multivariante posterior. Tanto los pacientes que tomaban omeprazol ( $n=55$ ) como los que tomaban pantoprazol ( $n=55$ ) mostraron valores de agregometría similares ( $170,8 \pm 84,1$  PRU y  $170,6 \pm 85,8$  PRU, respectivamente).

Los pacientes con tratamiento concomitante con IBP mostraron una duración del tratamiento significativamente menor (mediana=82,5 y rango 1-3079 días, media  $214,7 \pm 457,7$  días) en comparación con los que no lo recibían (mediana=82,5 y rango 1-2665 días, media  $592,4 \pm 811,3$  días),  $p=0,001$ . La incidencia de eventos isquémicos posteriores (8,8% de pacientes sin IBP frente al 10,9% de pacientes con IBP;  $p=0,768$ ) y hemorrágicos (5,9% de pacientes sin IBP frente al 9,1% de pacientes con IBP;  $p=0,732$ ) fue similar en aquellos pacientes con y sin tratamiento con IBP.

El resto de tratamientos concomitantes no ejercieron influencia sobre el valor de agregometría. Sin embargo, sí se observó una tendencia en los pacientes con tratamiento concomitante con ISRS (11 pacientes) a presentar mayores niveles de agregometría ( $187,1 \pm 58,6$  PRU) en comparación con los que no los tomaban ( $159,1 \pm 89,1$  PRU),  $p=0,308$ .

## 5. INFLUENCIA DEL FENOTIPO DE CYP2C19 EN EL EFECTO DE CLOPIDOGREL EN PACIENTES SOMETIDOS A NEUROINTERVENCIÓN PERCUTÁNEA

### 5.1. Frecuencias genotípicas de CYP2C19

Las frecuencias alélicas de *CYP2C19*\*2, *CYP2C19*\*3 y *CYP2C19*\*17 fueron similares a las descritas en el Proyecto 1000 genomas ([www.internationalgenome.org](http://www.internationalgenome.org))<sup>21</sup> para población europea (EUR) y población española (IBS), no encontrándose diferencias significativas (tabla 13).

**Tabla 13.** Frecuencias alélicas de CYP2C19 en nuestra población en comparación con población caucásica y española

Alelo CYP2C19	Nuestra población	Población EUR	Población IBS	Valor P
*2	12,8%	14,5%	14,5%	0,703
*3	0%	<1%	<1%	No significativo
*17	20,1%	22,4%	21,5%	0,593/0,827

Abreviaturas: CYP, citocromo P450; EUR, población europea; IBS, población española.

La tabla 14 muestra las frecuencias genotípicas y fenotípicas de *CYP2C19*. Las variantes genéticas *CYP2C19*\*2 y \*17 se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg. No encontramos ningún paciente portador del alelo *CYP2C19*\*3. No hubo diferencias en la distribución de frecuencias genotípicas y fenotípicas en cuanto al sexo.

**Tabla 14.** Frecuencias genotípicas y fenotípicas de CYP2C19 en nuestra población

	Todos (N=144)	Hombres (n=74)	Mujeres (n=70)	Valor P
<b>Genotipo CYP2C19</b>				
*1/*1	63 (43,8)	33 (44,6)	30 (49,2)	0,920
*1/*2	28 (19,4)	15 (20,3)	13 (18,6)	
*2/*2	2 (1,4)	1 (1,4)	1 (1,4)	
*2/*17	7 (4,9)	4 (5,4)	3 (4,3)	
*1/*17	37 (25,7)	19 (25,7)	18 (25,7)	
*17/*17	7 (4,9)	2 (2,7)	5 (7,1)	
<b>Fenotipo CYP2C19</b>				
PM	2 (1,4)	1 (1,4)	1 (1,4)	0,853
IM	35 (24,3)	19 (25,7)	16 (22,9)	
NM	63 (43,8)	33 (44,6)	30 (49,2)	
RM	37 (25,7)	19 (25,7)	18 (25,7)	
UM	7 (4,9)	2 (2,7)	5 (7,1)	

Los valores se muestran como n° de pacientes (%). Abreviaturas: CYP, citocromo P450; NM, metabolizador normal; IM, metabolizador intermedio; PM, metabolizador lento; RM, metabolizador rápido; UM, metabolizador ultrarrápido.

## 5.2. Características clínicas en los distintos fenotipos de CYP2C19

En la tabla 15 se desglosan las características clínicas de los pacientes en base a su fenotipo metabolizador de CYP2C19. No encontramos diferencias significativas entre los grupos metabolizadores ni en los factores de riesgo cardiovasculares, ni en la incidencia de eventos isquémicos y/o hemorrágicos previos o el número de pacientes con tratamiento concomitante con IBP. Tampoco se encontraron diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de cada tipo de intervención y su asociación con el fenotipo de CYP2C19 (tabla 16).

**Tabla 15.** Presencia de factores de riesgo cardiovascular, tratamiento concomitante y eventos previos de los pacientes en base a su fenotipo metabolizador de CYP2C19

<b>Características clínicas</b>	<b>IM-PM (n=37)</b>	<b>NM (n=63)</b>	<b>RM-UM (n=44)</b>	<b>Valor P</b>
<b>Factores de riesgo cardiovascular</b>	31 (83,8)	60 (95,2)	38 (86,4)	0,105
Hipertensión	20 (54,1)	46 (73,0)	25 (56,8)	0,101
Dislipemia	21 (56,8)	31 (49,2)	18 (40,9)	0,370
Obesidad	1 (2,7)	1 (1,6)	1 (2,3)	1,000
Fibrilación auricular	0 (0)	3 (4,8)	0 (0)	0,257
Diabetes mellitus	8 (21,6)	9 (14,3)	11 (25,0)	0,362
Fumadores	13 (35,1)	21 (33,3)	13 (29,5)	0,876
<b>Eventos isquémicos y hemorrágicos previos</b>				
Infarto agudo de miocardio	1 (2,7)	6 (9,5)	2 (4,5)	0,418
Accidente isquémico transitorio	4 (10,8)	6 (9,5)	6 (13,6)	0,750
Ictus isquémico	7 (18,9)	6 (9,5)	7 (15,9)	0,374
Ictus hemorrágico	3 (8,1)	4 (6,3)	4 (9,1)	0,855
<b>Pacientes con tratamiento concomitante</b>				
Anticoagulantes orales	1 (2,7)	3 (4,8)	0 (0,0)	0,370
Ácido acetilsalicílico	36 (97,3)	62 (98,4)	41 (93,2)	0,444
Heparina	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,3)	0,562
AINE	3 (8,1)	2 (3,2)	2 (4,5)	0,545
IBP	28 (75,7)	50 (79,4)	32 (72,7)	0,724
ISRS	3 (8,1)	6 (9,5)	2 (4,5)	0,668

Los valores se muestran como n° de pacientes (%). Abreviaturas: CYP, citocromo P450; NM, metabolizador normal; IM-PM, metabolizador intermedio-lento; RM-UM, metabolizador rápido-ultrarrápido; AINE, antiinflamatorios no esteroideos, IBP, inhibidores de la bomba de protones; ISRS, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina.

**Tabla 16.** Tipo de intervenciones realizadas de acuerdo al fenotipo de CYP2C19

<b>Motivo de la intervención</b>	<b>IM-PM (n=37)</b>	<b>NM (n=63)</b>	<b>RM-UM (n=44)</b>	<b>Valor P</b>
Aneurisma	21 (56,8)	26 (41,3)	20 (45,5)	0,320
Estenosis	16 (43,2)	37 (58,7)	24 (54,5)	0,320
<b>Tipo de intervención</b>				
Derivador de flujo	9 (24,3)	12 (19,0)	12 (27,3)	0,488
Aplicación de stent	25 (67,6)	46 (73,0)	25 (56,8)	
Aplicación de coils	3 (8,1)	3 (4,8)	6 (13,6)	
No aplicación de stent/coils	0 (0,0)	2 (3,2)	1 (2,3)	

Los valores se muestran como n° de pacientes (%). Abreviaturas: CYP, citocromo P450; NM, metabolizador normal; IM-PM, metabolizador intermedio-lento; RM-UM, metabolizador rápido-ultrarrápido.

### 5.3. Influencia de CYP2C19 en la agregación plaquetaria y desenlace clínico

En la tabla 17 se resumen los resultados del efecto sobre la agregación plaquetaria y la duración del tratamiento de los pacientes en base a su fenotipo metabolizador del CYP2C19.

**Tabla 17.** Efecto sobre la agregación plaquetaria y la duración del tratamiento de los pacientes de acuerdo con su fenotipo CYP2C19.

	<b>IM-PM (n=37)</b>	<b>NM (n=63)</b>	<b>RM-UM (n=44)</b>	<b>Valor P</b>
<b>Agregometría, PRU (n=141)</b>	200,1 ± 84,3*~	140,3 ± 89,2	157,9 ± 76,8	<b>0,004</b>
<b>Respondedores (n=141) <sup>α</sup></b>	13 (35,1)	42 (67,7)	24 (57,1)	<b>0,007</b>
<b>Reducción de dosis</b>	2 (5,4)	4 (6,3)	1 (2,3)	0,703
<b>Cambio de tratamiento</b>	11 (29,7)	5 (7,9)	4 (9,1)	<b>0,005</b>
<b>Duración del tratamiento</b>	80 (1-1623)§	80 (1-2582)	88 (1-3079)	0,073

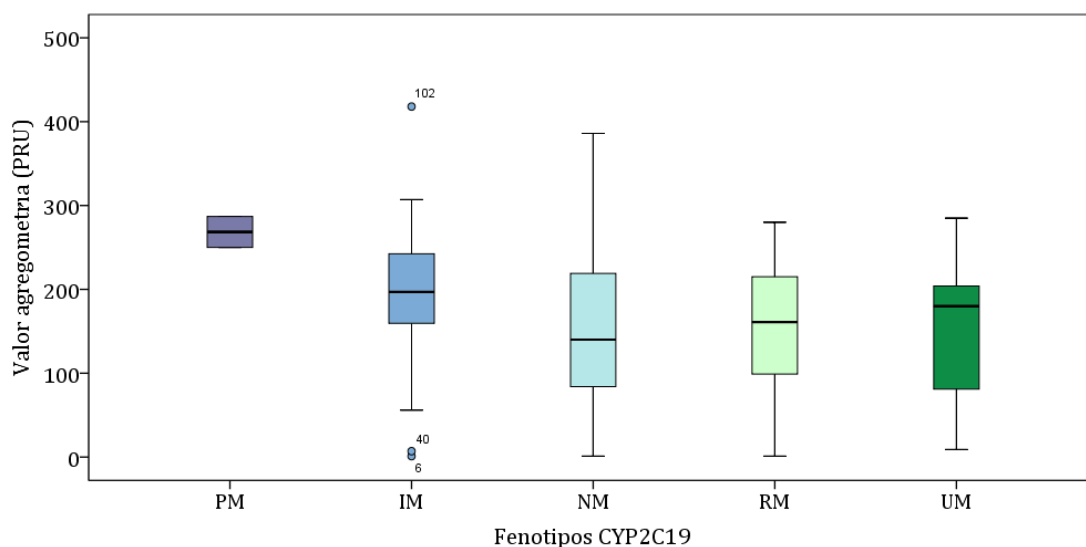
Los valores se muestran como media ± DS para la agregometría, mediana (rango) para la duración del tratamiento en días o n (%) para el resto. <sup>α</sup>Los pacientes se consideraron respondedores cuando los valores PRU estaban por debajo de 180. Abreviaturas: CYP, citocromo P450; NM, metabolizador normal; IM-PM, metabolizador intermedio-lento; RM-UM, metabolizador rápido-ultrarrápido; PRU, P2Y12 Reaction Unit. \*Bonferroni post-hoc p=0,003 vs. NM y p=0,085 vs. RM-UM. ~p=0,001 en análisis multivariante. §Duración del tratamiento significativamente menor: (coeficiente β no estandarizado= -235,6; p=0,027) en análisis multivariante.

Observamos ciertas diferencias estadísticamente significativas: los pacientes CYP2C19 IM-PM presentaron un valor de agregometría significativamente superior al resto de

#### IV. Resultados

grupos ( $200,1 \pm 84,3$  PRU), por encima del valor establecido para una buena respuesta antiplaquetaria (180 PRU). Por el contrario, tanto los pacientes CYP2C19 NM como los RM-UM presentaron valores de agregometría inferiores a 180 PRU. Del mismo modo, el porcentaje de pacientes respondedores fue significativamente menor en el caso de los pacientes CYP2C19 IM-PM (35,1%) que en los pacientes NM (67,7%) y RM-UM (57,1%). Además, un 29,7% de los pacientes CYP2C19 IM-PM requirieron un cambio de tratamiento, frente al 7,9% y 9,1% de los NM y RM-UM, respectivamente.

De hecho, si analizamos los 5 fenotipos de CYP2C19 por separado se aprecia que los dos únicos sujetos PM (con genotipo  $*2/*2$ ) presentan un valor de agregometría significativamente mayor ( $268,5 \pm 26,2$  PRU) con respecto al resto de grupos ( $196,2 \pm 84,9$  PRU en IM,  $140,3 \pm 89,2$  PRU en NM y  $158,8 \pm 73,6$  PRU en RM y  $151,8 \pm 108,0$  PRU en UM;  $p=0,013$ ) (figura 34), indicador de insuficiente respuesta a clopidogrel.



**Figura 34.** Valor de agregometría según el fenotipo de CYP2C19.

La parte inferior y superior del cuadro representan el primer y tercer cuartil, respectivamente. La banda dentro del cuadro corresponde al segundo cuartil (la mediana). Los bigotes se extienden a los valores máximo y mínimo de la serie o hasta 1.5 veces el rango intercuartílico. Los valores atípicos se representan con círculos.

En el fenotipo IM encontramos mucha variabilidad en la respuesta, incluso con dos sujetos con una respuesta exagerada (uno con genotipo  $*1/*2$  y el otro  $*2/*17$ . En concreto, respecto al genotipo CYP2C19  $*2/*17$  ( $n = 7$ ), que se clasifica como fenotipo IM según las guías, observamos que su valor medio de agregometría ( $174,9 \pm 106,5$

PRU) estaba entre el valor de agregometría de los pacientes *CYP2C19* \*1/\*1 (n = 62) ( $140,3 \pm 89,2$  PRU) y \*1/\*2 pacientes (n = 28) ( $201,5 \pm 80,1$  PRU), por lo que creemos que se encuentran correctamente clasificados dentro del grupo IM.

#### 5.4. Efecto de *CYP2C19* sobre la incidencia de eventos clínicos

Con respecto al tipo de eventos clínicos relacionados con el fenotipo de *CYP2C19* (tabla 18), la prevalencia de eventos isquémicos fue menor en el grupo de RM-UM (2,3%) en comparación con IM-PM (10,8%) y NM (15,9%),  $p=0,060$ . El tiempo hasta la aparición de un evento isquémico se muestra en la figura 35. La mediana del tiempo de tratamiento hasta la aparición de un evento isquémico en el grupo *CYP2C19* IM-PM fue de 56 días, con un rango de 0-1350 días de seguimiento. En el grupo NM la mediana fue de 56 días, con un rango de 0-1976 días de seguimiento. Finalmente, en el grupo RM-UM la mediana fue de 61 días, con un rango de 1-2000 días de seguimiento.

**Tabla 18.** Incidencia de eventos clínicos posteriores en base al fenotipo metabolizador de *CYP2C19*

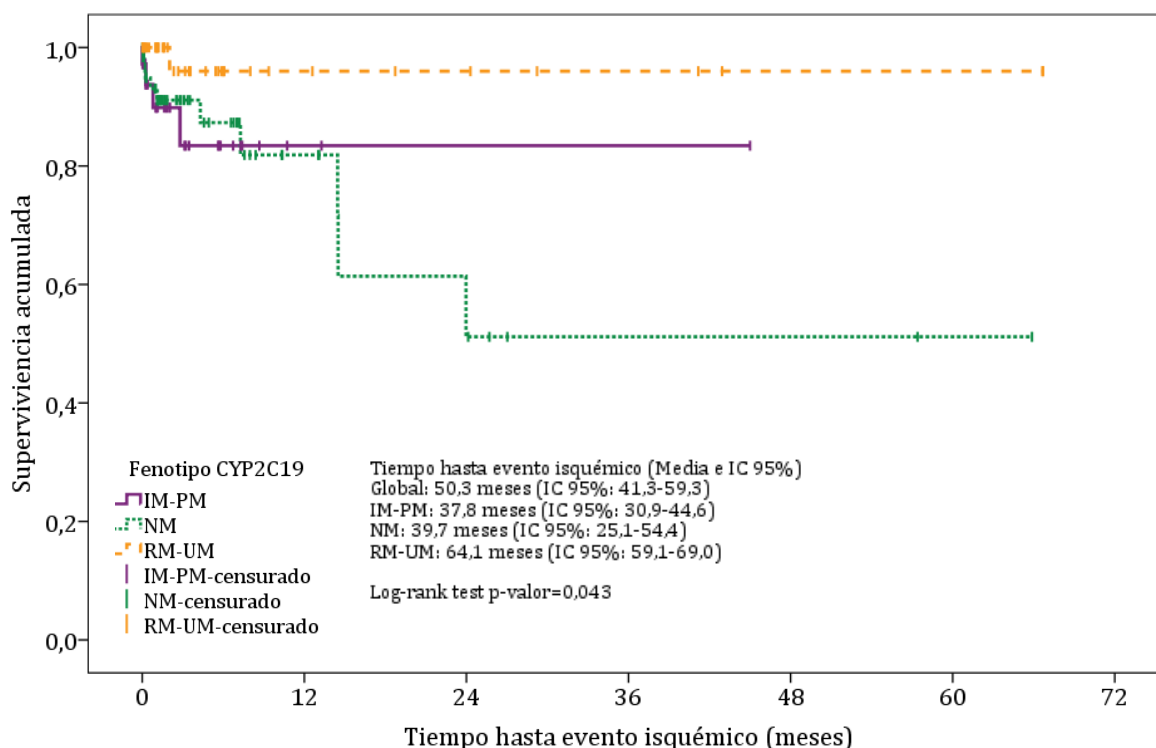
Evento clínico posterior	IM-PM (n=37)	NM (n=63)	RM-UM (n=44)	Valor P
<b>Presencia de evento posterior</b>	5 (13,9)	14 (22,2)	8 (18,2)	0,543
<b>Total de eventos isquémicos</b>	4 (10,8)	10 (15,9)	1 (2,3) <sup>s</sup>	0,060
Accidente isquémico transitorio	2 (5,4)	1 (1,6)	0 (0)	0,343
Ictus isquémico	2 (5,4)	3 (4,8)	0 (0)	0,380
Re-estenosis del stent	1 (2,7)	6 (9,5)	1 (2,3)	0,261
<b>Total de eventos hemorrágicos</b>	1 (2,7)	5 (7,9)	7 (15,9) <sup>▫</sup>	0,109
Ictus hemorrágico	0 (0)	2 (3,2)	2 (4,5)	0,687
Hemorragia subaracnoidea	0 (0)	0 (0)	1 (2,3)	0,562
Otras hemorragias	1 (2,7)	3 (4,8)	5 (11,4)	0,245
<b>Éxito</b>	0 (0)	2 (3,2)	2 (4,5)	0,687

Los valores se expresan como n (%). Nótese que un paciente *CYP2C19* NM sufrió una hemorragia subaracnoidea y también epistaxis, considerada dentro de “otras hemorragias”. Además, otra paciente *CYP2C19* RM-UM sufrió un ictus hemorrágico y también una hemorragia subaracnoidea. Del mismo modo, un paciente *CYP2C19* IM-PM sufrió un accidente isquémico transitorio y un ictus isquémico. Abreviaturas: CYP, citocromo P450; NM, metabolizador normal; IM-PM, metabolizador intermedio-lento; RM-UM, metabolizador rápido-ultrarrápido. <sup>s</sup>Factor predictor de la incidencia de eventos isquémicos (Odds ratio=0,091; IC 95% 0,010-0,850;  $p=0,036$ ) en análisis multivariante. <sup>▫</sup>Factor predictor de la incidencia de eventos hemorrágicos (Odds ratio=3,6; IC 95% 1,07-12,04;  $p=0,038$ ) en análisis multivariante.

#### IV. Resultados

A pesar de que hubo diferencias significativas entre las funciones de supervivencia de los tres grupos ( $p=0,043$ ) para el desarrollo de eventos isquémicos (figura 35), la comparación por pares con el test Log-Rank no detectó diferencias significativas en IM-PM frente a NM ( $p=0,996$ ) y IM-PM vs. RM-UM ( $p=0,076$ ); mientras que hubo una diferencia en NM vs. RM-UM ( $p=0,017$ ).

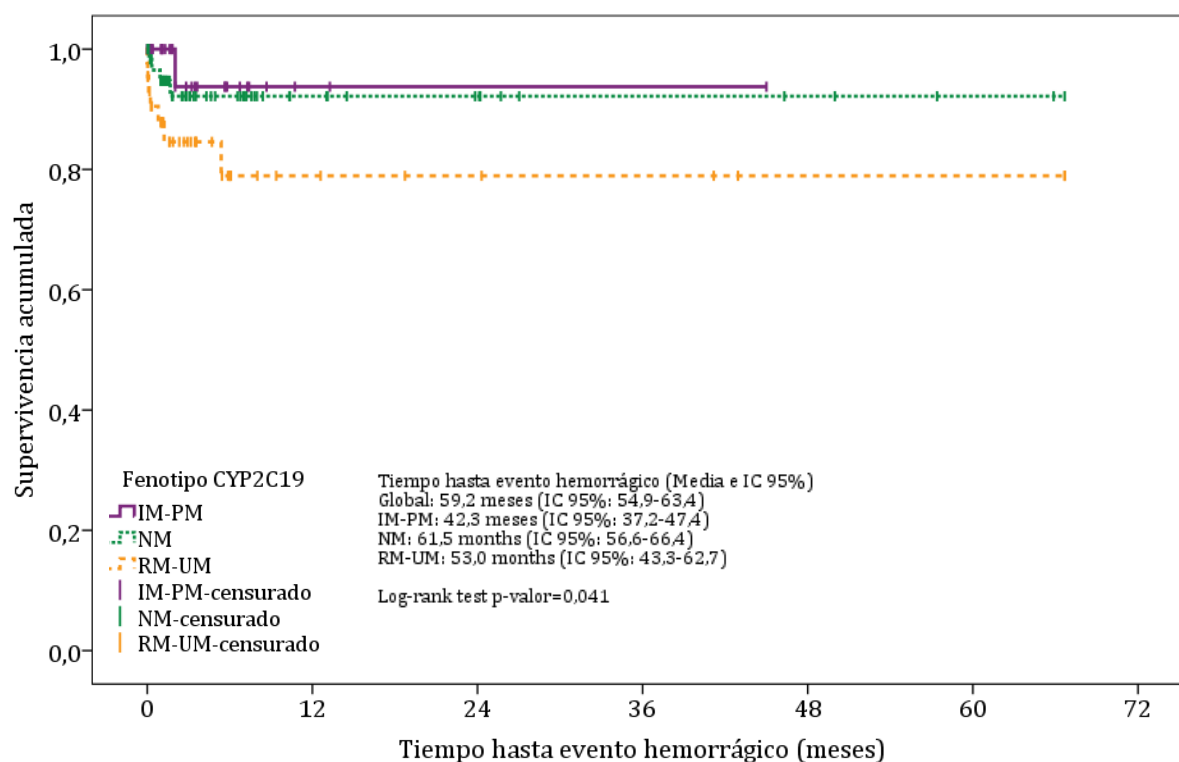
Los residuos tipificados con corrección de Haberman indicaron que la frecuencia de eventos isquémicos en el grupo de NM (15,9%) no fue significativamente más alta en comparación con la esperada (9,7%), mientras que las frecuencias observadas en el grupo RM-UM fueron significativamente más bajas (2,3%) de lo esperado bajo la hipótesis de independencia entre variables.



Nº de pacientes		Tiempo hasta el evento (meses)								
		Basal	1	2	3	6	12	24	48	60
Fenotipo	IM-PM	37	23	16	13	7	2	1	0	0
	NM	63	49	31	27	21	10	5	2	1
	RM-UM	44	36	25	22	13	9	7	1	1

**Figura 35.** Tiempo hasta la aparición de un evento isquémico estudiado mediante análisis de supervivencia de Kaplan-Meier.

Por otro lado, el porcentaje de eventos hemorrágicos difirió entre los diferentes fenotipos. La mayor prevalencia de eventos hemorrágicos se dio en el grupo RM-UM (15,9%) en comparación con NM (7,9%) e IM-PM (2,7%),  $p=0,109$  (tabla 18). La figura 36 muestra el tiempo hasta la aparición de un evento hemorrágico.



Nº de pacientes		Tiempo hasta el evento (meses)								
Fenotipo		Basal	1	2	3	6	12	24	48	60
	IM-PM	37	24	16	13	7	2	1	0	0
	NM	63	52	34	30	24	13	9	4	2
	RM-UM	44	33	23	20	11	7	4	1	1

**Figura 36.** Tiempo hasta la aparición de un evento hemorrágico estudiado mediante análisis de supervivencia de Kaplan-Meier.

La mediana del tiempo de tratamiento hasta la aparición de un evento hemorrágico en todos los grupos es de 61 días, con un rango de 1-1350 días de seguimiento en el



#### IV. Resultados

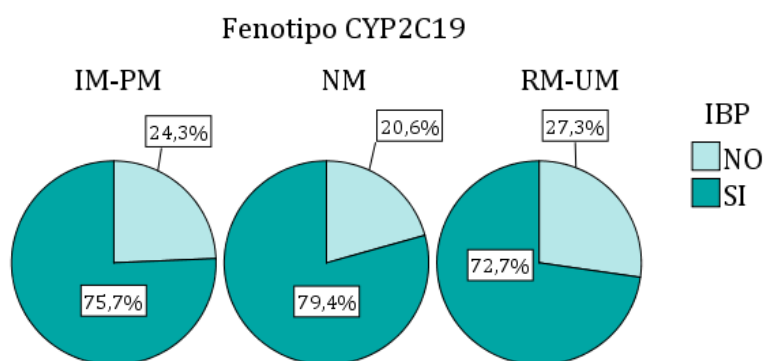
grupo CYP2C19 IM-PM, un rango de 0-2000 días de seguimiento en el grupo NM y, finalmente, un rango de 1-2000 días de seguimiento en el grupo RM-UM.

Hubo diferencias entre los grupos con respecto al tiempo de inicio del evento hemorrágico ( $p=0,041$ ). Sin embargo, la comparación por pares con el estadístico Log-Rank no detectó diferencias significativas: IM-PM vs. NM ( $p=0,547$ ); IM-PM vs. RM-UM ( $p=0,078$ ); NM vs. RM-UM ( $p=0,097$ ). A pesar de ello, los residuos tipificados con corrección de Haberman indicaron que la frecuencia de eventos hemorrágicos en el grupo RM-UM (15,9%) fue significativamente más alta de lo esperado según la hipótesis de independencia entre las variables (8,3%), mientras que las frecuencias observadas en los grupos IM-PM (2,7%) y NM (7,9%) no difirieron significativamente de las frecuencias esperadas.

Durante los procedimientos neurointervencionistas, como ya se ha mencionado, 4 pacientes experimentaron una hemorragia debido a una perforación de una arteria que no se contabilizaron entre los eventos producidos por clopidogrel. Dos de ellos fueron IM-PM, uno fue NM y otro fue RM-UM.

##### 5.5. Influencia del tratamiento con IBP en los distintos fenotipos de CYP2C19

La figura 37 muestra la tasa de consumo de IBP en los distintos fenotipos metabolizadores de CYP2C19. Como se puede apreciar, esta tasa era superior al 70% en todos ellos, llegando a alcanzar prácticamente el 80% en el caso del fenotipo NM.



**Figura 37.** Tasa de consumo de IBP en los distintos fenotipos de CYP2C19.

En la tabla 19 se presentan los datos de respuesta en cuanto al valor de agregometría y la incidencia de eventos clínicos en los pacientes con y sin tratamiento concomitante con IBP. Los pacientes que tomaban IBP y tenían un fenotipo CYP2C19 IM-PM tuvieron un valor de agregometría significativamente mayor, indicador de poca respuesta (sólo el 28,6% de los pacientes fueron respondedores). Sin embargo, en pacientes sin tratamiento con IBP no se observa esta diferencia, la diferencia significativa reside en los pacientes con fenotipo CYP2C19 NM, los cuales alcanzan una respuesta muy superior (el 83,3% son respondedores). En la figura 38 se observa una comparativa del valor de agregometría en los distintos fenotipos de CYP2C19 de acuerdo al tratamiento concomitante con IBP. De estos resultados se podría inferir que el uso concomitante de IBP provoca que los sujetos IM pasen a ser no respondedores, que el porcentaje de respuesta de los NM disminuya, pero no tiene un efecto llamativo sobre los pacientes con fenotipo RM-UM.

**Tabla 19.** Influencia del tratamiento concomitante con IBP en el valor de agregometría y en la incidencia de eventos clínicos acorde a los distintos fenotipos de CYP2C19.

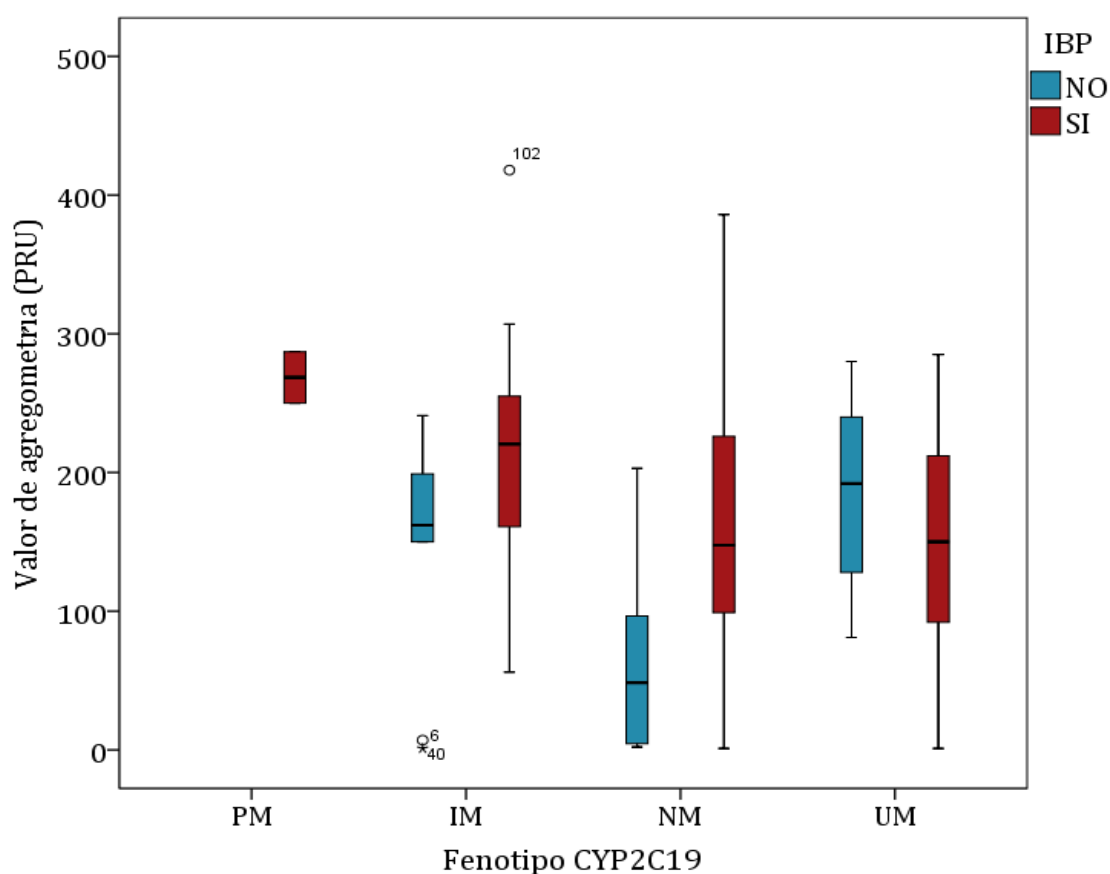
	Fenotipo CYP2C19	Valor agregometría PRU (n=141) a, b	Pacientes respondedores <sup>c</sup>	Eventos isquémicos	Eventos hemorrágicos
<b>Con IBP</b>	IM-PM (n=28)	216,6 ± 77,8	8 (28,6)	4 (14,3)	1 (3,6)
	NM (n=50)	152,3 ± 84,0	32 (64,0)	7 (14,0)	4 (8,0)
	RM-UM (n=32)	149,3 ± 78,0	19 (61,3)	1 (3,1)	6 (18,8)
	Valor P	<b>0,003</b>	<b>0,006</b>	0,220	0,143
<b>Sin IBP</b>	IM-PM (n=9)	148,7 ± 87,3	5 (55,6)	0 (0,0)	0 (0,0)
	NM (n=13)	65,3 ± 72,2	10 (83,3)	3 (23,1)	1 (7,7)
	RM-UM (n=12)	182,5 ± 70,9	5 (45,5)	0 (0,0)	1 (8,3)
	Valor P	<b>0,003</b>	0,199	0,099	1,000

<sup>a</sup>El valor de agregometría solo estuvo disponible para 141 pacientes genotipados para CYP2C19. Los valores se expresan como n (%) excepto <sup>b</sup> media ± DS. <sup>c</sup> Los pacientes se consideraron respondedores cuando los valores de PRU fueron menores a 180.

Aunque no fue significativo, al comparar la incidencia de eventos clínicos posteriores solo en pacientes que recibieron IBP según su fenotipo, observamos que los sujetos

#### IV. Resultados

RM-UM sufrieron más eventos hemorrágicos (18,8% frente a 8% en NM y 3,6% en IM-PM,  $p=0,143$ ) mientras que la incidencia de eventos isquémicos fue similar entre los grupos IM-PM (14,3%) y NM (14%) y más baja en el grupo RM-UM (3,1%),  $p=0,220$ . Por lo tanto, para evitar la influencia de los inhibidores de CYP2C19, se analizó la influencia de los fenotipos en la incidencia de eventos clínicos posteriores en pacientes sin tratamiento concomitante con IBP. En este caso, se observó una mayor incidencia de eventos isquémicos en NM (23,1%) en comparación con IM-PM (0%) y RM-UM (0%), aunque no fue significativa, junto con una mayor incidencia de eventos hemorrágicos en RM-UM (8,3%) en comparación con NM (7,7%) e IM-PM (0%).



**Figura 38.** Valor de agregometría en los fenotipos de CYP2C19 de acuerdo al tratamiento con IBP.

La parte inferior y superior del cuadro representan el primer y tercer cuartil, respectivamente. La banda dentro del cuadro corresponde al segundo cuartil (la mediana). Los bigotes se extienden a los valores máximo y mínimo de la serie o hasta 1.5 veces el rango intercuartílico. Los valores atípicos se representan con círculos.

## **6. INFLUENCIA DE ENZIMAS CYP450, CES1, PON1, ABCB1 Y P2RY12 EN EL EFECTO DE CLOPIDOGREL EN PACIENTES SOMETIDOS A NEUROINTERVENCIÓN PERCUTÁNEA**

En relación con los resultados de este apartado se ha publicado el siguiente artículo, incluido en el anexo I:

### **❖ Influence of CYP450 enzymes, CES1, PON1, ABCB1 and P2RY12 polymorphisms on clopidogrel response in patients subjected to a percutaneous neurointervention**

Saiz-Rodríguez M, Belmonte C, Caniego JL, Koller D, Zubiaur P, Bárcena E, Romero-Palacián D, Eugene AR, Ochoa D, Abad-Santos F.

Clin Ther. 2019. Aceptado.

Factor de impacto: 3,185 (Q2)

### 6.1. Frecuencias genotípicas de todos los genes analizados

En la tabla 20 se muestran el conjunto de frecuencias genotípicas y fenotípicas de todos los genes incluidos en el estudio<sup>E</sup>. Las frecuencias alélicas fueron similares a las descritas en población europea. No se observaron diferencias significativas en la distribución de genotipos y/o fenotipos entre hombres y mujeres, excepto en CYP2B6 en el que el porcentaje de PM era superior en mujeres.

**Tabla 20.** Frecuencias genotípicas de los genes analizados

	Todos (N=140)	Hombres (n=72)	Mujeres (n=68)	Valor P
<b>Genotipo CYP2C19</b> (N=144, 74 hombres, 70 mujeres)				
*1/*1	63 (43,8)	33 (44,6)	30 (49,2)	0,920
*1/*2	28 (19,4)	15 (20,3)	13 (18,6)	
*2/*2	2 (1,4)	1 (1,4)	1 (1,4)	
*2/*17	7 (4,9)	4 (5,4)	3 (4,3)	
*1/*17	37 (25,7)	19 (25,7)	18 (25,7)	
*17/*17	7 (4,9)	2 (2,7)	5 (7,1)	
<b>Fenotipo CYP2C19</b> (N=144, 74 hombres, 70 mujeres)				
IM-PM	37 (25,7)	20 (27,0)	17 (24,3)	0,828
NM	63 (43,8)	33 (44,6)	30 (49,2)	
RM-UM	44 (30,6)	21 (28,4)	23 (32,9)	
<b>Genotipo CYP1A2</b>				
*1/*1B	6 (4,2)	4 (5,6)	2 (2,9)	0,128
*1/*1F	11 (7,8)	4 (5,6)	7 (10,3)	
*1C/*1F	2 (1,4)	0 (0,0)	2 (2,9)	
*1C/*1B	2 (1,4)	0 (0,0)	2 (2,9)	
*1F/*1B	51 (36,4)	29 (40,3)	22 (32,4)	
*1B/*1B	49 (35,0)	29 (40,3)	20 (29,4)	
*1C/*1C	1 (0,7)	0 (0,0)	1 (1,5)	
*1F/*1F	18 (12,8)	6 (8,3)	12 (17,6)	
<b>Fenotipo CYP1A2</b>				
PM	1 (0,7)	0 (0,0)	1 (1,5)	0,799
NM/RM	70 (50,0)	37 (51,4)	33 (48,5)	
UM	69 (49,3)	35 (48,6)	34 (50,0)	

<sup>E</sup> De los 144 pacientes genotipados para *CYP2C19* como prueba asistencial que se realiza en el Servicio de Farmacología Clínica desde 2013, sólo 140 muestras de ADN estaban disponibles en el momento actual para el genotipado del resto de genes. Al tratarse de un estudio retrospectivo no se consideró la posibilidad de pedir una muestra de sangre a los pacientes para una nueva extracción de ADN, pues no estaría justificada.

	Todos (N=140)	Hombres (n=72)	Mujeres (n=68)	Valor P
Genotipo CYP2B6				
*1/*1	62 (44,3)	36 (50,0)	26 (38,2)	0,204
*1/*5	16 (11,4)	8 (11,1)	8 (11,8)	
*1/*9	45 (32,1)	24 (33,3)	21 (30,9)	
*5/*5	3 (2,1)	0 (0,0)	3 (4,4)	
*5/*9	3 (2,1)	1 (1,4)	2 (2,9)	
*9/*9	11 (7,8)	3 (4,1)	8 (11,8)	
Fenotipo CYP2B6				
PM	17 (12,1)	4 (5,6)	13 (19,1)	0,040
IM	61 (43,6)	32 (44,4)	29 (42,6)	
NM	62 (44,3)	36 (50,0)	26 (38,2)	
Genotipo CYP2C9				
*1/*1	71 (50,7)	37 (51,4)	34 (50,0)	0,936
*1/*2	39 (27,8)	20 (27,8)	19 (27,9)	
*1/*3	21 (15,0)	11 (15,3)	10 (14,7)	
*2/*2	4 (2,9)	2 (2,8)	2 (2,9)	
*2/*3	4 (2,9)	1 (1,4)	3 (4,4)	
*3/*3	1 (0,7)	1 (1,4)	0 (0,0)	
Fenotipo CYP2C9				
PM-IM	69 (49,3)	35 (48,6)	34 (50,0)	1,000
NM	71 (50,7)	37 (51,4)	34 (50,0)	
Genotipo CYP2C8				
*1/*1	76 (54,3)	42 (58,3)	34 (50,0)	0,486
*1/*2	2 (1,4)	0 (0,0)	2 (2,9)	
*1/*3	41 (29,3)	21 (29,2)	20 (29,4)	
*1/*4	13 (9,3)	6 (8,3)	7 (10,3)	
*3/*3	3 (2,1)	2 (2,8)	1 (1,5)	
*3/*4	5 (3,6)	1 (1,4)	4 (5,9)	
Fenotipo CYP2C8				
PM-IM	64 (45,7)	30 (41,7)	34 (50,0)	0,396
NM	76 (54,3)	42 (58,3)	34 (50,0)	
Genotipo CYP3A4				
*1/*1	123 (87,9)	64 (88,9)	59 (86,8)	0,763
*1/*22	16 (11,4)	7 (9,7)	9 (13,2)	
*22/*22	1 (0,7)	1 (1,4)	0 (0,0)	
Fenotipo CYP3A4				
PM-IM	17 (12,1)	8 (11,1)	9 (13,2)	0,798
NM	123 (87,9)	64 (88,9)	59 (86,8)	
Genotipo CYP3A5				
*1/*3	16 (11,4)	7 (9,7)	9 (13,2)	0,798
*1/*6	1 (0,7)	1 (1,4)	0 (0,0)	
*3/*3	121 (86,4)	63 (87,5)	58 (85,3)	
*3/*6	2 (1,4)	1 (1,4)	1 (1,5)	

#### IV. Resultados

	Todos (N=140)	Hombres (n=72)	Mujeres (n=68)	Valor P
Fenotipo <i>CYP3A5</i>				
No expresores	123 (87,9)	64 (88,9)	59 (86,8)	0,798
Expresores	17 (12,1)	8 (11,1)	9 (13,2)	
Genotipo <i>PON1</i>				
rs662				0,187
T/T	65 (46,4)	35 (48,6)	30 (44,1)	
T/C	56 (40,0)	31 (43,1)	25 (36,8)	
C/C	19 (13,6)	6 (8,3)	13 (19,1)	
rs854560				0,632
A/A	64 (45,7)	30 (41,7)	34 (50,0)	
A/T	54 (38,6)	30 (41,7)	24 (35,3)	
T/T	22 (15,7)	12 (16,7)	10 (14,7)	
rs705379				0,150
G/G	31 (22,1)	12 (16,7)	19 (27,9)	
G/A	69 (49,3)	35 (48,6)	34 (50,0)	
A/A	40 (28,6)	25 (34,7)	15 (22,2)	
Fenotipo <i>PON1</i>				
PM (n=114)	114 (81,4)	63 (87,5)	51 (75,0)	0,175
IM (n=19)	19 (13,6)	7 (9,7)	12 (17,6)	
NM (n=7)	7 (4,9)	2 (2,8)	5 (7,4)	
Genotipo <i>CES1</i>				
rs71647871				0,497
C/C	138 (98,6)	70 (97,2)	68 (100)	
C/T	2 (1,4)	2 (2,8)	0 (0,0)	
Genotipo <i>ABCB1</i>				
C3435T				0,553
C/C	41 (29,3)	20 (27,8)	21 (30,9)	
C/T	80 (57,1)	40 (55,6)	40 (58,8)	
T/T	19 (13,6)	12 (16,7)	7 (10,3)	
C1236T				0,916
C/C	47 (33,6)	23 (31,9)	24 (35,3)	
C/T	75 (53,6)	40 (55,6)	35 (51,5)	
T/T	18 (12,9)	9 (12,5)	9 (13,2)	
G2677TA				0,723
C/C	43 (30,7)	20 (27,8)	23 (33,8)	
C/A	74 (52,8)	40 (55,6)	34 (50,0)	
C/T	8 (5,7)	5 (6,9)	3 (4,4)	
A/A	14 (10,0)	6 (8,3)	8 (11,8)	
A/T	1 (0,7)	1 (1,4)	0 (0,0)	
Haplotipo <i>ABCB1</i>				
Wild-type	30 (21,4)	14 (19,4)	16 (23,5)	0,399
Heterocigoto	83 (59,3)	41 (56,9)	42 (61,8)	
Mutado	27 (19,3)	17 (23,6)	10 (14,7)	

	Todos (N=140)	Hombres (n=72)	Mujeres (n=68)	Valor P
Genotipo P2RY12				
rs2046934				
G/G	104 (74,3)	52 (72,7)	52 (76,5)	0,388
G/A	32 (22,9)	19 (26,4)	13 (19,1)	
A/A	4 (2,9)	1 (1,4)	3 (4,4)	
rs6798347				
G/G	88 (62,9)	45 (62,5)	43 (63,2)	1,000
G/A	46 (32,9)	24 (33,3)	22 (32,4)	
A/A	6 (4,3)	3 (4,2)	3 (4,4)	
rs6809699				
C/C	105 (75,0)	52 (72,2)	53 (77,99)	0,309
C/A	31 (22,1)	19 (26,4)	12 (17,6)	
A/A	4 (2,9)	1 (1,4)	3 (4,4)	
rs9859552				
G/G	93 (66,4)	47 (65,3)	46 (67,6)	0,200
G/T	40 (28,6)	19 (26,4)	21 (30,9)	
T/T	7 (5,0)	6 (8,3)	1 (1,5)	
rs16846673				
T/T	140 (100)	72 (100)	68 (100)	
rs6785930				
G/G	70 (50,0)	38 (52,8)	32 (47,1)	0,769
G/A	61 (43,6)	30 (41,7)	31 (45,6)	
A/A	9 (6,4)	4 (5,6)	5 (7,4)	
rs10935838				
G/G	103 (73,6)	51 (70,8)	52 (76,5)	0,318
G/A	33 (23,6)	20 (27,8)	13 (19,1)	
A/A	4 (2,9)	1 (1,4)	3 (4,4)	
rs5853517				
_/_	104 (74,3)	52 (72,2)	52 (76,5)	0,388
_/T	32 (22,9)	19 (26,4)	13 (19,1)	
T/T	4 (2,9)	1 (1,4)	3 (4,4)	
rs6801273				
C/C	60 (42,9)	32 (44,4)	28 (41,2)	0,940
C/T	66 (47,1)	33 (45,8)	33 (48,5)	
T/T	14 (10,0)	7 (9,7)	7 (10,3)	
rs6787801				
G/G	39 (27,8)	20 (27,8)	19 (27,9)	0,976
G/A	62 (44,3)	31 (43,1)	31 (45,6)	
A/A	39 (27,8)	21 (29,2)	18 (26,5)	
Haplotipo P2RY12				
H1	103 (73,6)	51 (98,1)	52 (94,5)	0,618
H2	4 (2,9)	1 (1,9)	3 (5,5)	



## 6.2. Influencia de las enzimas CYP450

No hubo influencia de las enzimas CYP2C9, CYP2C8, CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4 o CYP3A5 en el valor de agregometría, ni en el porcentaje de pacientes respondedores a clopidogrel (tabla 21).

**Tabla 21.** Influencia de las enzimas CYP450 en el valor de agregometría

<b>Gen</b>	<b>Genotipo Fenotipo/Haplotipo</b>	<b>Valor agregometría, PRU <sup>a, b</sup></b>	<b>Pacientes respondedores <sup>c</sup></b>
<b>CYP2C19 (n=141)</b>	PM-IM (n=37)	200,1 ± 84,3	13 (35,1)
	NM (n=62)	140,3 ± 89,2	42 (67,7)
	RM-UM (n=42)	157,9 ± 76,8	24 (57,1)
	Valor p	<b>0,004</b>	<b>0,007</b>
<b>CYP2C9 (n=137)</b>	PM-IM (n=69)	153,7 ± 85,9	39 (56,5)
	NM (n=68)	173,8 ± 86,3	36 (52,9)
	Valor p	0,173	0,733
<b>CYP2C8 (n=137)</b>	PM-IM (n=64)	150,7 ± 85,7	38 (59,4)
	NM (n=73)	175,1 ± 86,0	37 (50,7)
	Valor p	0,100	0,390
<b>CYP1A2 (n=137)</b>	PM (n=1)	60	1 (100)
	NM/RM (n=68)	157,2 ± 86,0	41 (60,3)
	UM (n=68)	171,7 ± 86,5	33 (48,5)
	Valor p	0,303	0,201
<b>CYP2B6 (n=137)</b>	PM (n=17)	170,1 ± 65,3	11 (64,7)
	IM (n=58)	153,1 ± 82,9	33 (56,9)
	NM (n=62)	171,8 ± 94,4	31 (50,0)
	Valor p	0,474	0,518
<b>CYP3A4 (n=137)</b>	PM-IM (n=16)	148,7 ± 99,1	11 (68,8)
	NM (n=121)	165,7 ± 84,7	64 (52,9)
	Valor p	0,464	0,290
<b>CYP3A5 (n=137)</b>	No expresores (n=120)	161,4 ± 88,1	68 (56,7)
	Expresores (n=17)	179,6 ± 73,6	7 (41,2)
	Valor p	0,418	0,300

<sup>a</sup>El valor de agregometría solo estuvo disponible para 141 pacientes genotipados para CYP2C19 y 137 pacientes genotipados para el resto de genes. Los valores se expresan como n (%) para la variable respondedores y <sup>b</sup> media ± DS para el valor de agregometría.

<sup>c</sup> Los pacientes se consideraron respondedores cuando los valores de PRU fueron menores a 180.

De todas las enzimas CYP450 analizadas sólo la isoforma CYP2C19 influyó sobre el valor de agregometría y porcentaje de respuesta de los pacientes, como se ha visto en el apartado 5. Aunque no fue significativo, el único sujeto CYP1A2 PM presentó un valor de agregometría llamativamente inferior, indicando una mejor respuesta al tratamiento con clopidogrel, sin embargo, al sólo encontrar un sujeto portador de genotipo *CYP1A2* \*1C/\*1C no se pueden afirmar que esta isoforma tenga una influencia directa en la agregometría. El sujeto tenía un genotipo \*1/\*1 de *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP2C8*, *CYP3A4*, *CES1* y *PON1* y un genotipo *CYP3A5* \*3/\*3 y *CYP2B6* \*1/\*9.

En cuanto a la incidencia de eventos clínicos, los pacientes con fenotipo CYP2C9 PM-IM y CYP2C8 PM-IM presentaron mayor número de eventos isquémicos (tabla 22), aunque no alcanzó la significación estadística.

**Tabla 22.** Influencia de las enzimas CYP450 en la incidencia de eventos clínicos

Gen	Genotipo/Fenotipo/ Haplotipo	Eventos isquémicos	Eventos hemorrágicos
<b>CYP2C19 (n=144)</b>	PM-IM (n=37)	4 (10,8)	1 (2,7)
	NM (n=63)	10 (15,9)	5 (7,9)
	RM-UM (n=44)	1 (2,3)	7 (15,9)
	Valor P	0,060	0,109
<b>CYP2C9 (n=140)</b>	PM-IM (n=69)	11 (15,9)	5 (7,2)
	NM (n=71)	4 (5,6)	8 (11,3)
	Valor P	0,059	0,563
<b>CYP2C8 (n=140)</b>	PM-IM (n=64)	10 (15,6)	6 (9,4)
	NM (n=76)	5 (6,6)	7 (9,2)
	Valor P	0,104	1,000
<b>CYP1A2 (n=140)</b>	PM (n=1)	0 (0,0)	0 (0,0)
	NM/RM (n=70)	7 (10,0)	7 (10,0)
	UM (n=69)	8 (11,6)	6 (8,7)
	Valor P	0,814	1,000
<b>CYP2B6 (n=140)</b>	PM (n=17)	3 (17,6)	2 (11,8)
	IM (n=61)	7 (11,5)	4 (6,6)
	NM (n=62)	5 (8,1)	7 (11,3)
	Valor P	0,508	0,646
<b>CYP3A4 (n=140)</b>	PM-IM (n=17)	3 (17,6)	3 (17,6)
	NM (n=123)	12 (9,8)	10 (8,1)
	Valor P	0,395	0,196

Gen	Genotipo/Fenotipo/ Haplotipo	Eventos isquémicos	Eventos hemorrágicos
<b>CYP3A5 (n=140)</b>	No expresores (n=123)	12 (9,8)	12 (9,8)
	Expresores (n=17)	3 (17,6)	1 (5,9)
	Valor P	0,395	1,000

Como se ha reflejado en el apartado 5, también se observó una tendencia en los sujetos CYP2C19 RM-UM a presentar menor incidencia de eventos isquémicos y mayor incidencia de eventos de carácter hemorrágico.

### 6.3. Influencia de las enzimas CES1 y PON1

En cuanto a CES1, la enzima que metaboliza el 85% de clopidogrel a metabolito inactivo, observamos como los dos únicos pacientes portadores del genotipo C/T del polimorfismo G143E mostraron un valor de agregometría llamativamente más bajo (74 y 44 PRU, respectivamente) aunque por el limitado número de sujetos no alcanzó la significación estadística (tabla 23). Además, es destacable que ambos sujetos eran CYP2C19 RM-UM. Por otro lado, aunque PON1 no influyó en el valor de agregometría, aunque hay una tendencia hacia mejor respuesta en los sujetos NM. Ninguna de las dos enzimas tuvo un efecto sobre la incidencia de eventos isquémicos y/o hemorrágicos.

**Tabla 23.** Influencia de las enzimas CES1 y PON1 en el valor de agregometría y en la incidencia de eventos clínicos

Gen	Genotipo /Fenotipo (n=140)	Valor agregometría PRU (n=137) <sup>a, b</sup>	Pacientes respondedores <sup>c</sup> (n=137)	Eventos isquémicos (n=140)	Eventos hemorrágicos (n=140)
<b>CES1 G143E</b>	C/C (n=138)	165,2 ± 86,0	71 (54,1)	15 (10,9)	13 (9,4)
	C/T (n=2)	59,0 ± 21,2	2 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Valor P	0,084	0,501	1,000	1,000
<b>PON1</b>	PM (n=114)	165,3 ± 86,6	59 (52,7)	15 (13,2)	11 (9,6)
	IM (n=19)	164,1 ± 86,3	11 (57,9)	0 (0,0)	1 (5,3)
	NM (n=7)	130,2 ± 90,6	5 (83,3)	0 (0,0)	1 (14,3)
	Valor P	0,626	0,358	0,184	0,700

<sup>a</sup>El valor de agregometría solo estuvo disponible para 137 pacientes. Los valores se expresan como n (%) excepto <sup>b</sup> media ± DS. <sup>c</sup> Los pacientes se consideraron respondedores cuando los valores de PRU fueron menores a 180.

#### 6.4. Influencia del transportador glicoproteína-P

Hubo una tendencia hacia un valor de agregometría menor en los pacientes con alelos mutados de los polimorfismos C3435T, C1236T y G2677T/A del gen *ABCB1*. De hecho, el porcentaje de respondedores fue significativamente mayor en pacientes con el haplotipo mutado ( $p=0,009$ ) (tabla 24). Sin embargo, no hubo asociación entre los haplotipos de *ABCB1* y la incidencia de eventos isquémicos o hemorrágicos, aunque sí pudo observarse cierta tendencia a presentar menos eventos isquémicos en pacientes con haplotipo mutado.

**Tabla 24.** Influencia del haplotipo del transportador *ABCB1* en el valor de agregometría y en la incidencia de eventos clínicos

Gen	Haplotipo (n=140)	Valor agregometría PRU (n=137) <sup>a, b</sup>	Pacientes respondedores <sup>c</sup> (n=137)	Eventos isquémicos (n=140)	Eventos hemorrágicos (n=140)
<b>ABCB1</b>	<i>Wild-type</i> (n=30)	168,7 ± 87,0	13 (43,3)	4 (13,3)	2 (6,7)
	Heterocigoto (n=83)	165,7 ± 88,5	41 (50,6)	10 (12,0)	9 (10,8)
	Mutado(n=27)	151,7 ± 80,9	21 (80,8)	1 (3,7)	2 (7,4)
	Valor P	0,727	<b>0,009</b>	0,478	0,922

<sup>a</sup>El valor de agregometría solo estuvo disponible para 137 pacientes genotipados. Los valores se expresan como n (%) excepto <sup>b</sup> media ± DS. <sup>c</sup> Los pacientes se consideraron respondedores cuando los valores de PRU fueron menores a 180.

#### 6.5. Influencia del receptor P2Y12

Se encontró una asociación significativa en el genotipo heterocigoto del rs9859552, quienes presentaban un valor de agregometría superior y menor tasa de respuesta. El resto de los polimorfismos individuales o los haplotipos H1 y H2 de *P2RY12* (incluyendo rs10935838, rs2046934, rs5853517 y rs6809699) no influyeron en el valor de agregometría (tabla 25). Por otro lado, el porcentaje de eventos hemorrágicos fue superior en el genotipo T/T del rs6801273, donde el 16,7% de estos pacientes presentaron alguna hemorragia. Cabe destacar que la mitad de estos pacientes portaban el fenotipo CYP2C19 RM-UM. No hubo otra asociación entre los polimorfismos de *P2RY12* y la incidencia de eventos isquémicos o hemorrágicos.

**Tabla 25.** Influencia del haplotipo del receptor P2RY12 en el valor de agregometría y en la incidencia de eventos clínicos

P2RY12	Genotipo	Valor agregometría PRU (n=137) <sup>a, b</sup>	Pacientes respondedores <sup>c</sup> (n=137)	Eventos isquémicos (n=140)	Eventos hemorrágicos (n=140)
<b>rs2046934</b>	A/A (n=101)	167,4 ± 86,2	54 (53,5)	10 (9,6)	9 (8,7)
	A/G (n=32)	150,4 ± 89,1	19 (59,4)	5 (15,6)	4 (12,5)
	G/G (n=4)	177,0 ± 78,1	2 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Valor P	0,601	0,882	0,586	0,665
<b>rs6798347</b>	G/G (n=88)	165,6 ± 83,2	48 (54,5)	10 (11,4)	7 (8,0)
	G/A (n=43)	165,2 ± 94,9	22 (51,2)	4 (8,7)	6 (13,0)
	A/A (n=6)	125,5 ± 71,7	5 (83,3)	1 (16,7)	0 (0,0)
	Valor P	0,545	0,364	0,608	0,564
<b>rs6809699</b>	C/C (n=102)	167,0 ± 85,8	55 (53,9)	10 (9,5)	9 (8,6)
	C/A (n=31)	151,0 ± 90,5	18 (58,1)	5 (16,1)	4 (12,9)
	A/A (n=4)	177,0 ± 78,1	2 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Valor P	0,637	0,939	0,577	0,658
<b>rs9859552</b>	G/G (n=92)	149,3 ± 83,4	57 (62,0)	9 (9,7)	6 (6,5)
	G/T (n=38)	202,0 ± 88,9	12 (31,6)	6 (15,0)	7 (17,5)
	T/T (n=7)	144,0 ± 45,2	6 (85,7)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Valor P	<b>0,005</b>	<b>0,001</b>	0,473	0,098
<b>rs6785930</b>	G/G (n=67)	165,7 ± 82,3	33 (49,3)	7 (10,0)	10 (14,3)
	G/A (n=61)	169,9 ± 92,0	34 (55,7)	8 (13,1)	3 (4,9)
	A/A (n=9)	106,8 ± 59,5	8 (88,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Valor P	0,119	0,076	0,515	0,105
<b>rs10935838</b>	G/G (n=100)	167,2 ± 86,6	53 (53,0)	10 (9,7)	9 (8,7)
	G/A (n=33)	151,3 ± 87,8	20 (60,6)	5 (15,2)	4 (12,1)
	A/A (n=4)	177,0 ± 78,1	2 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Valor P	0,627	0,783	0,595	0,674
<b>rs5853517</b>	_/_ (n=101)	167,4 ± 86,2	54 (53,5)	10 (9,6)	9 (8,7)
	_/_T (n=32)	150,4 ± 89,1	19 (59,4)	5 (15,6)	4 (12,5)
	T/T (n=4)	177,0 ± 78,1	2 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Valor P	0,601	0,882	0,586	0,665
<b>rs6801273</b>	C/C (n=14)	153,9 ± 81,4	8 (57,1)	0 (0,0)	0 (0,0)
	C/T (n=66)	159,7 ± 95,3	38 (57,6)	8 (12,1)	3 (4,5)
	T/T (n=57)	170,7 ± 77,2	29 (50,9)	7 (11,7)	10 (16,7)
	Valor P	0,706	0,775	0,495	<b>0,030</b>
<b>rs6787801</b>	G/G (n=39)	158,3 ± 87,6	24 (61,5)	4 (10,3)	4 (10,3)
	G/A (n=61)	169,4 ± 80,8	28 (45,9)	6 (9,7)	3 (4,8)
	A/A (n=37)	159,9 ± 95,4	23 (62,2)	5 (12,8)	6 (15,4)
	Valor P	0,784	0,182	0,939	0,180

P2RY12	Genotipo	Valor agregometría PRU (n=137) <sup>a, b</sup>	Pacientes respondedores <sup>c</sup> (n=137)	Eventos isquémicos (n=140)	Eventos hemorrágicos (n=140)
<b>Haplotipo</b>	H1 (n=103)	167,2 ± 86,6	53 (53,0)	10 (9,7)	9 (8,7)
	H2 (n=4)	177,0 ± 78,1	2 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Valor P	0,825	1,000	1,000	1,000

<sup>a</sup>El valor de agregometría solo estuvo disponible para 137 pacientes. Los valores se expresan como n (%) excepto <sup>b</sup> media ± DS. <sup>c</sup> Los pacientes se consideraron respondedores cuando los valores de PRU fueron menores a 180.

## 7. RESULTADOS DEL ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Se realizó un análisis de regresión múltiple considerando el valor de agregometría, la tasa de respuesta y la incidencia de eventos isquémicos y hemorrágicos como variables dependientes. Se incluyó sexo, edad, polimorfismos en todos los genes analizados, presencia de factores de riesgo cardiovascular (hipertensión, dislipemia, obesidad, fibrilación auricular, diabetes mellitus y ser fumador), eventos isquémicos o hemorrágicos previos, tipo de intervención y tratamiento concomitante con IBP como variables independientes. Los resultados se muestran en las tablas 26 a 29.

En resumen, la edad, el tratamiento concomitante con IBP y el fenotipo CYP2C19 IM-PM fueron predictores de peor respuesta a clopidogrel asociada a un mayor valor de agregometría. Además, la intervención con un derivador de flujo fue un factor predictor de una mejor respuesta, en comparación con las intervenciones con stent o coils. Estos cuatro factores explican el 26,4% de la varianza del modelo ( $r^2=0,327$ ), siendo el fenotipo IM-PM de CYP2C19 el que más porcentaje de la varianza explica (9,1%) (tabla 26). Por otra parte, al transformar el valor de agregometría en una variable categórica, observamos que la edad y el fenotipo CYP2C19 IM-PM se mantuvieron como indicadores de peor respuesta. Además, el haplotipo *ABCB1* mutado se reveló como un predictor de una mejor respuesta ( $r^2=0,433$ ) (tabla 27). Además, como se muestra en la tabla 28, el fenotipo CYP2C19 RM-UM fue un factor protector y la duración del tratamiento un factor de riesgo para el desarrollo de algún evento isquémico. Finalmente, con respecto a la predicción de eventos hemorrágicos, el fenotipo CYP2C19 RM-UM fue el único factor de riesgo (tabla 29).

**Tabla 26.** Regresión lineal con valor de agregometría como variable dependiente.

Predictores del valor de agregometría	Variables que contribuyen al bloqueo del receptor P2Y12					Bloqueo del receptor P2Y12
	Coefficiente $\beta$ no estandarizado	Valor P	Correlación semiparcial	Contribución a la varianza del modelo	Contribución aditiva a la varianza del modelo	
Edad	2,235	0,001	0,288	8,2%	8,2%	Peor respuesta
CYP2C19 IM-PM	59,519	<0,001	0,302	9,1%	17,3%	Peor respuesta
Derivador de flujo	-52,848	0,004	-0,243	5,9%	23,2%	Mejor respuesta
IBP	38,404	0,029	0,181	3,2%	26,4%	Peor respuesta
R <sup>2</sup> ajustada= 0,327						

**Tabla 27.** Regresión logística con la variable respondedor como variable dependiente

Variables que contribuyen al bloqueo del receptor P2Y12 (PRU $\geq$ 180 = no respondedor)					
Predictores de la tasa de respuesta	Odds-Ratio	IC 95% inferior	IC 95% superior	Valor P	Bloqueo del receptor P2Y12
Edad	0,895	0,849	0,943	<0,001	Peor respuesta
CYP2C19 IM-PM	0,149	0,045	0,498	0,002	Peor respuesta
ABCB1 mutado	6,298	1,555	25,499	0,010	Mejor respuesta
R <sup>2</sup> = 0,433					

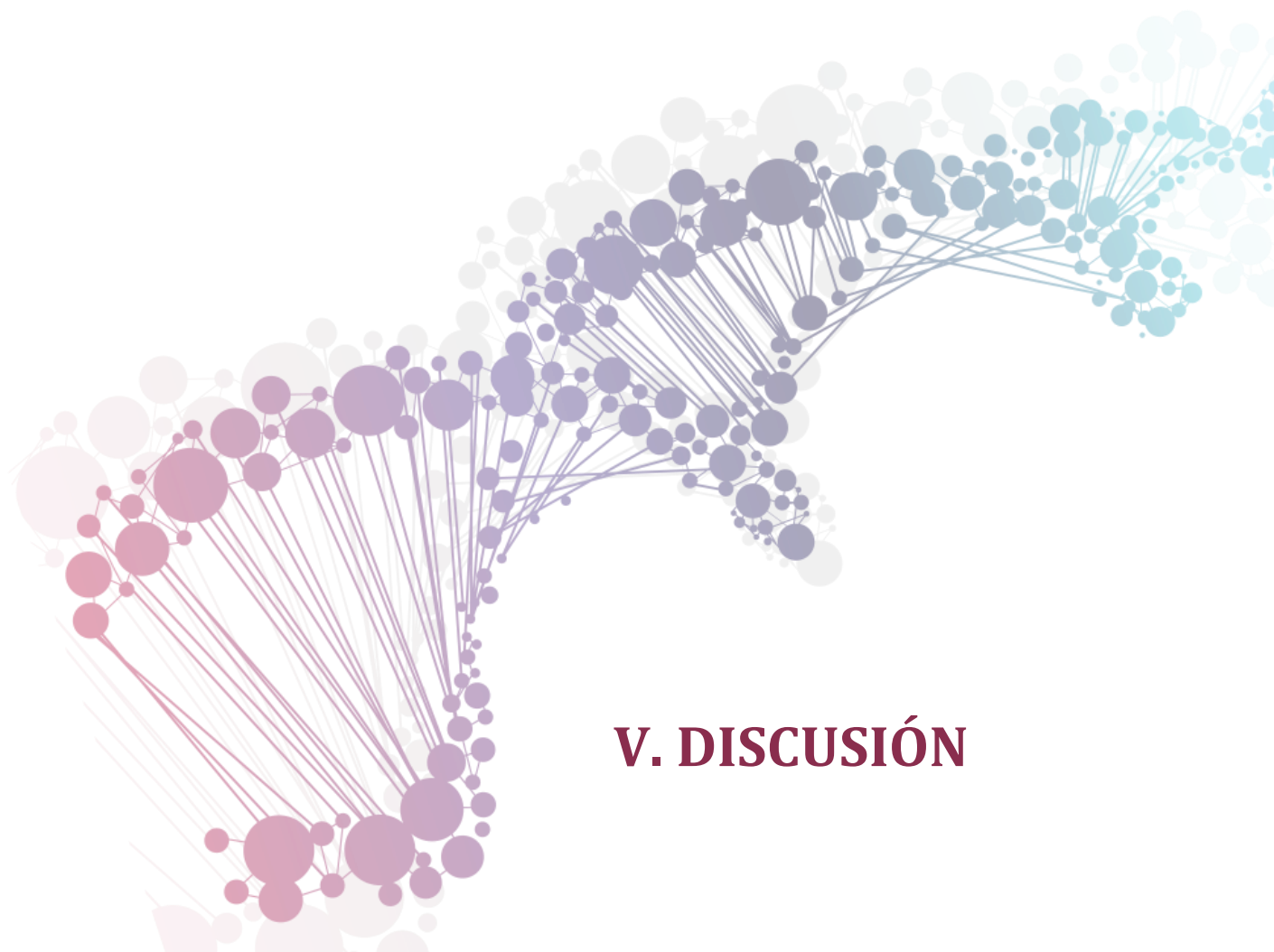
**Tabla 28.** Regresión logística con la incidencia de eventos isquémicos como variable dependiente.

Variables predictoras de la incidencia de eventos isquémicos					
Predictores de isquemia	Odds-Ratio	IC 95% inferior	IC 95% superior	Valor P	Variable
CYP2C19 RM-UM	0,060	0,003	1,076	0,056	Factor protector
Duración del tratamiento (meses)	1,041	1,007	1,077	0,017	Factor de riesgo
R <sup>2</sup> = 0,255					

**Tabla 29.** Regresión logística con la incidencia de eventos hemorrágicos como variable dependiente.

Variables predictoras de la incidencia de eventos hemorrágicos					
Predictores de hemorragia	Odds-Ratio	IC 95% inferior	IC 95% superior	Valor P	Variable
CYP2C19 RM-UM	3,60	1,071	12,1	0,038	Factor de riesgo
R <sup>2</sup> = 0,070					

No obstante, como el tamaño muestral no es muy grande, el intervalo de confianza del odds ratio es muy amplio y no podemos estimar con precisión cuánto disminuye el riesgo de eventos isquémicos o cuánto aumenta el riesgo de eventos hemorrágicos el ser portador de un alelo *CYP2C19*\*17.



## V. DISCUSIÓN



## 1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS

La edad media de nuestra cohorte de pacientes se situó en los 64 años, lo cual está dentro del rango habitual de edades entre las que se comprende el mayor porcentaje de pacientes que sufren este tipo de patologías (entre los 35 y 70 años) <sup>48</sup>. El porcentaje de pacientes que presentaban algún tipo de FRCV (90%) es muy alto, lo que no nos ha permitido establecer comparaciones significativas entre los pacientes que tenían y no FRCV. Sin embargo, sí se observaron diferencias entre los FRCV, los eventos isquémicos y hemorrágicos previos y el tipo de intervención entre los sexos. Los hombres presentaban más FRCV que las mujeres, especialmente dislipemia. Nuestros resultados están en consonancia con los descritos por Gil Moltalbán *et al.* en cuanto a los FRCV en población adulta de la Comunidad de Madrid, donde los hombres presentaban mayores tasas de FRCV que las mujeres en todas las franjas de edad <sup>148</sup>. También se encontró más frecuentemente en los hombres antecedentes de infarto agudo de miocardio y AIT, mientras que la incidencia de ictus hemorrágico previo fue superior en las mujeres. Un 36% de los pacientes tenían antecedentes de eventos isquémicos y hemorrágicos previos, pero estos no se correlacionaron con la incidencia de eventos recurrentes, como cabría esperar, ya que se ha descrito que los pacientes con AIT o ictus isquémico previos tienen un riesgo aumentado de padecer un evento isquémico recurrente durante el primer año <sup>149</sup>. Este riesgo puede haber sido revertido por el tratamiento endovascular, ya que se asocia a una baja morbilidad y a una gran factibilidad técnica en el tratamiento de aneurismas <sup>150</sup>. En cuanto al tratamiento de las estenosis, la angioplastia y colocación de stents es una técnica compleja que, llevada a cabo por personal correctamente cualificado, tiene una morbilidad no superior a la de la endarterectomía <sup>151</sup>.

## 2. TRATAMIENTO NEUROUTERVENCIÓNISTA

El 46,5% de los pacientes fueron intervenidos por la presencia de un aneurisma, los cuales fueron más frecuentemente hallados en mujeres, lo que coincide con los datos ya descritos <sup>48</sup>. Además, el 2,1% de estos aneurismas desembocaron en una HSA tras

su rotura, lo cual entra dentro de lo esperable puesto que el riesgo de rotura de un aneurisma se sitúa en un 0,2-3% anual, dependiendo de su forma, tamaño y localización <sup>48</sup>. Por el contrario, el 53,5% de los pacientes fueron intervenidos por una estenosis, siendo más frecuente en hombres que en mujeres, algo que cabría esperar pues los factores de riesgo más asociados a la estenosis (hipertensión, diabetes, dislipemia y el consumo de tabaco) eran más frecuentes en hombres <sup>148</sup>.

El tipo de intervención más frecuente fue la aplicación de un stent, seguido de derivador de flujo y coils. La diferencia detectada en la frecuencia de cada intervención en cuanto al sexo se debe a que la aplicación de stents en hombres es mayoritaria por el mayor número de estenosis a tratar, puesto que estas son principalmente tratadas con stent (85%), frente a derivador de flujo (9%) y coils (3%). En el caso de las mujeres, que fueron mayoritariamente intervenidas por un aneurisma, lo hicieron principalmente con la aplicación de stents (47%), derivadores de flujo (37%) y coils (14%), para la derivación del flujo sanguíneo y la obstrucción del aneurisma.

Además, analizando la influencia de estos factores en el desenlace clínico de los pacientes, observamos que el tipo de intervención afecta a la duración del tratamiento, siendo este mayor cuando se aplica un derivador de flujo y stents, en comparación con los coils. Esto coincide con lo esperable puesto que el tratamiento antiagregante es necesario prolongarlo más cuanto más tupido sea el material con el que se va a realizar la neurointervención, para evitar la agregación plaquetaria.

### 3. DESENLACE CLINICO DE LOS PACIENTES

#### 3.1. Efecto sobre la agregación plaquetaria

La media del valor de agregometría se situó en  $161,3 \pm 87,3$  PRU, lo que indica que la mayoría de los pacientes consiguen una buena respuesta antiagregante. Sin embargo, cuando estos valores de agregometría se clasifican en respondedores ( $\text{PRU} < 180$ ) o no respondedores ( $\text{PRU} \geq 180$ ), vemos que el porcentaje de no respondedores es del 44%. Este dato se encuentra en consonancia con lo descrito para patología cardiaca, puesto

que el porcentaje de no respondedores se sitúa en un rango de 5-56% en pacientes con stent coronario <sup>77</sup>. El porcentaje de no respondedores a clopidogrel tras procedimientos neurointervencionistas se sitúa en un 66% <sup>131</sup>, por lo que en nuestra población se ha alcanzado una buena respuesta en más pacientes de lo que a priori cabría esperar.

No hay un valor de corte estandarizado para categorizar a los pacientes en respondedores o no respondedores, por lo que nosotros hemos adoptado lo que la guía de uso del sistema VerifyNow describe como efecto del fármaco ( $PRU < 180$ ) como respondedor y ausencia de efecto del fármaco ( $PRU \geq 180$ ) como no respondedor <sup>152</sup>. Otros estudios sitúan el punto de corte en una inhibición plaquetaria por clopidogrel  $\geq 40\%$ , respecto al valor basal antes de administrar el tratamiento, como un indicador aceptable de efecto del fármaco <sup>153</sup>. Para otros autores una inhibición plaquetaria  $\leq 50\%$  por clopidogrel se definió como una respuesta inadecuada <sup>154</sup>. Sería necesario establecer un punto de corte estandarizado para poder comparar los resultados de los estudios lo más objetivamente posible.

En nuestra población de estudio, la edad influye sobre el valor de agregometría (coeficiente  $\beta$  no estandarizado=2,23), siendo un indicador de peor respuesta. Este resultado está en consonancia con lo descrito previamente puesto que, igual que en otros procesos metabólicos, la conversión de clopidogrel a su metabolito activo puede verse afectada con la edad por disminución de la capacidad metabólica hepática en pacientes más ancianos, lo que podría provocar una alta reactividad plaquetaria. De hecho, en el estudio publicado por Gremmel *et al.*, la reactividad plaquetaria inducible por ADP aumentó linealmente con la edad después de ajustar por los FRCV, el tipo de intervención, la medicación, la proteína C reactiva y la función renal <sup>155</sup>. En nuestra población, algunos FRCV como la dislipemia, diabetes mellitus y haber padecido un AIT e ictus hemorrágico previamente influían sobre el valor de agregometría, aunque esta asociación no se mantuvo significativa en el análisis multivariante tras ajustar por otros factores tales como el sexo, la edad y los genotipos.

El valor de agregometría ayuda a los clínicos a tomar decisiones en cuanto al tratamiento con clopidogrel, hecho que se refleja en que los pacientes en los que se realizó un cambio de tratamiento tenían valores de agregometría muy altos ( $223,8 \pm 97,8$  PRU). Por otro lado, les sirvió para ajustar la dosis en pacientes con valores de agregometría muy bajos ( $25,4 \pm 63,3$  PRU).

### 3.2. Incidencia de eventos isquémicos y hemorrágicos durante el tratamiento con clopidogrel

A pesar de los beneficios de la doble antiagregación con ácido acetilsalicílico y clopidogrel para la prevención de complicaciones tromboembólicas, hay un subgrupo de pacientes en los que se desarrollan eventos isquémicos recurrentes.

En nuestra población, se observó una menor incidencia de eventos isquémicos durante el tratamiento con clopidogrel (10,4%) y una mayor incidencia de eventos hemorrágicos (9,0%), aunque la mayoría son hemorragias extracraneales, en comparación con los encontrados en la literatura en pacientes con infarto de miocardio que recibieron clopidogrel (13,6% y 2,1%, respectivamente) <sup>156</sup>. Sin embargo, la incidencia de eventos tromboembólicos recurrentes en pacientes tras una intervención intracraneal para tratar aneurismas es del 6%, bajo doble antiagregación <sup>157</sup>. Por otro lado, la incidencia de complicaciones hemorrágicas intracraneales se sitúa en el 8% <sup>157</sup>, por encima de la incidencia de ictus hemorrágico (2,8%) y HSA (0,7%) en nuestra población de estudio.

En el caso de las estenosis, la incidencia de ictus recurrente o muerte a los 4 años tras la implantación de un stent se sitúa en 6,8% <sup>158</sup>. Aunque el valor de eventos isquémicos recurrentes totales sea del 10,4%, si analizamos cada uno de ellos por separado vemos que la incidencia de cada uno es menor a lo esperado (6-7%). En nuestra población, la incidencia de AIT fue del 2,1%, de ictus isquémico del 3,5% y la re-estenosis del stent del 5,6%, todos ellos por debajo del 6%.

Por otra parte, como cabría esperar, a pesar de no ser significativo, se observó que la estenosis aumentaba la incidencia de eventos isquémicos; no así los aneurismas, que no se correlacionaron con la incidencia de eventos hemorrágicos.

En cuanto a la mortalidad, la tasa se situó en el 2,8%, aunque uno de los pacientes falleció por una obstrucción intestinal y no por una complicación trombótica o hemorrágica. Dos pacientes (1,4%) fallecieron tras un ictus hemorrágico, dato inferior a lo reportado previamente en otros estudios (2,4%) en patologías coronarias tras el tratamiento con clopidogrel <sup>159</sup>. Por último, 1 paciente (0,7%) falleció tras una hemorragia durante el procedimiento, dato que se sitúa por debajo de lo descrito referente a la mortalidad por el procedimiento (1,5%), que se consideran complicaciones de la terapia endovascular (perforación, trombosis, embolia y mala posición de los dispositivos) <sup>150</sup>.

El aumento de la preocupación por esa subpoblación de pacientes que siguen sufriendo algún evento isquémico a pesar de recibir doble antiagregación lleva a estudiar el fenómeno de la hiporespuesta antiplaquetaria <sup>131</sup>. En parte, esta preocupación hace que los clínicos controlen más de cerca a los pacientes que no alcanzan la respuesta esperada una vez antiagregados. En el caso en que los pacientes son identificados como hiporespondedores, la alternativa más común es recurrir a un cambio de tratamiento antiagregante, por lo que se conoce como “resistencia a clopidogrel”, para evitar en la medida de lo posible el desarrollo de eventos isquémicos recurrentes. Las posibles opciones terapéuticas se detallarán más adelante.

#### **4. INFLUENCIA DEL USO DE MEDICACIÓN CONCOMITANTE**

El 98% de los pacientes se encontraban recibiendo tratamiento concomitante, mayoritariamente ácido acetilsalicílico (96,5%) e IBP (76,4%). La amplia prescripción de ácido acetilsalicílico está justificada, debido a la indicación de doble antiagregación plaquetaria en pacientes que se van a someter a procedimientos

neurointervencionistas. También pudo haber influido el alto porcentaje de pacientes con FRCV (90%) como historia previa de ictus isquémico o infarto agudo de miocardio, puesto que muchos de ellos estaban siendo tratados previamente con ácido acetilsalicílico.

Sorprende el porcentaje de pacientes que tomaban IBP, puesto que se recomienda evitar el uso concomitante de estos fármacos con clopidogrel a no ser que se necesite incondicionalmente <sup>136</sup>, como en pacientes en tratamiento crónico con AINE o pacientes con historia previa de úlcera o sangrado gastrointestinal. Actualmente, existe una sobre-prescripción de IBP en la práctica clínica habitual. De hecho, se ha descrito que sólo el 28% de los pacientes que son dados de alta con una prescripción de IBP tenían una correcta indicación para el tratamiento con los mismos <sup>160</sup>. En este aspecto, se debe tomar conciencia e intentar mejorar la prescripción de IBP para reducir las posibles interacciones entre fármacos <sup>160</sup>. Por lo tanto, recomendamos reevaluar a estos pacientes y suspender el IBP para evitar interacciones cuando no exista una indicación clara para su administración.

Todos los IBP inhiben la actividad de la enzima CYP2C19, aunque se ha descrito que omeprazol y esomeprazol ejercen una mayor inhibición <sup>135</sup>. Omeprazol reduce la exposición al metabolito activo de clopidogrel en un 40% y la inhibición plaquetaria en un 30% <sup>161</sup>. En consonancia con estos datos, en nuestro estudio comprobamos que los pacientes que tomaban IBP mostraron valores de agregometría significativamente superiores. Sin embargo, esta reducción en la respuesta a clopidogrel no se tradujo en un aumento de la incidencia de eventos isquémicos, probablemente por el reducido tamaño muestral. En este sentido, se ha reportado que no hay diferencia en la frecuencia de eventos cardiovasculares entre los pacientes que son tratados con o sin IBP <sup>162</sup>, aunque el uso concomitante de IBP si se asoció a un mayor riesgo de eventos cardiovasculares en los portadores del alelo *CYP2C19\*2* <sup>162</sup>. En nuestro estudio también se confirma que son los metabolizadores intermedios los que sufren una

mayor reducción de la respuesta antiagregante cuando reciben un IBP ( $216,6 \pm 77,8$  PRU en pacientes IM-PM con IBP vs.  $148,7 \pm 87,3$  PRU en pacientes IM-PM sin IBP).

Por otra parte, en nuestro estudio la mitad de los pacientes que tomaban IBP recibían omeprazol y la otra mitad pantoprazol. Los datos revelan prácticamente la misma respuesta a clopidogrel en pacientes que tomaban ambos fármacos, por lo que se deduce que el efecto de pantoprazol es equiparable al de omeprazol. Este dato contradice el estudio de Choi *et al.* que afirma que el pantoprazol no reduce el efecto antiplaquetario de clopidogrel <sup>163</sup>. En cualquier caso, es recomendable evitar el uso concomitante de IBP, pudiéndose sustituir por ratinidina, fármaco que se metaboliza por la vía del CYP2C19 pero en menor medida que los IBP y que ha demostrado no influir en la inhibición plaquetaria de clopidogrel <sup>164</sup>.

El reducido tamaño muestral y el bajo porcentaje de pacientes que tomaban cualquiera de los otros tratamientos concomitantes (ACO, ISRS, AINE, heparina) impidió encontrar una diferencia significativa en la respuesta a clopidogrel. No obstante, es necesario tener en cuenta que se debe evitar el uso concomitante de inhibidores/inductores de CYP2C19, fármacos metabolizados a través de CYP2C19, porque podrían afectar a la farmacocinética, o fármacos que puedan interferir con la farmacodinamia de clopidogrel.

Además, en el caso de los ISRS como sertralina, se ha descrito un riesgo aumentado de hemorragias cuando se administran de forma concomitante con medicamentos que actúan sobre la función plaquetaria (como AINES, ácido acetilsalicílico y ticlopidina) <sup>165</sup>, por lo que se aconseja evitar su uso concomitante con clopidogrel.

## 5. INFLUENCIA DE LA ENZIMA CYP2C19

Como ya se ha comentado previamente, la respuesta a clopidogrel varía en un amplio rango (5-56%). Hay varios factores que alteran la respuesta a clopidogrel, como la edad, el índice de masa corporal, los tratamientos concomitantes, comorbilidades y la

adherencia al tratamiento, aunque todos esos factores explican menos del 10% de la variabilidad <sup>100</sup>, por lo que el papel de los polimorfismos genéticos puede ser de relevancia. Además, alcanzar la ventana terapéutica de clopidogrel minimizando el riesgo de eventos trombóticos o hemorrágicos supone un gran reto para los clínicos. En este sentido, y en patología mayoritariamente cardíaca, ya se ha comprobado que el genotipado de *CYP2C19* y la cuantificación de la agregometría ayudan a determinar qué pacientes podrían estar en riesgo de sufrir este tipo de eventos <sup>84</sup>. Los pacientes que reciben una terapia antiplaquetaria personalizada basada en el genotipo de *CYP2C19* son más proclives a alcanzar una mejor respuesta <sup>166</sup>. De hecho, comparando una rama de tratamiento con ticagrelor y otra guiada por el genotipo de *CYP2C19* (portadores del alelo \*2 recibían prasugrel y no portadores clopidogrel), vieron que estos últimos alcanzaban la ventana terapéutica antiplaquetaria (>85 PRU <208) en un 50% frente a un 4% de los pacientes tratados con ticagrelor <sup>166</sup>.

El hecho de que la enzima *CYP2C19* sea tan polimórfica implica una expresión génica y por tanto una actividad enzimática alterada, que podría explicar en parte esa variabilidad interindividual en la respuesta. El análisis farmacogenético de *CYP2C19* puede ayudar a identificar qué pacientes son los que se encuentran en un riesgo incrementado de trombosis o sangrado durante el tratamiento con clopidogrel, pudiéndose así elegir la estrategia terapéutica más apropiada para cada paciente.

### 5.1. Influencia del alelo *CYP2C19*\*2

Un alta reactividad plaquetaria se reconoce comúnmente como un factor de riesgo predictor de eventos isquémicos <sup>167-169</sup>, así como la presencia de alelos no funcionales de *CYP2C19* <sup>90-92</sup>. En la literatura se describen varios casos clínicos que demuestran esa asociación entre los alelos no funcionales de *CYP2C19* y una menor respuesta a clopidogrel <sup>170,171</sup>, lo que conlleva a un mayor riesgo de trombosis <sup>172</sup>. Sin embargo, a pesar de la vasta evidencia, no siempre se ha podido correlacionar la incidencia de eventos isquémicos con los alelos no funcionales de *CYP2C19* <sup>173</sup>.



De acuerdo con lo esperado, en nuestro estudio hemos encontrado que los pacientes con un fenotipo CYP2C19 IM-PM tenían mayores niveles de agregometría ( $200,1 \pm 84,3$  PRU), lo que se correlaciona con una menor tasa de respuesta a clopidogrel. De hecho, los dos únicos pacientes PM presentaban niveles de agregometría significativamente mayores que los otros 4 grupos, con una media de 268 PRU, dato que está muy por encima de lo establecido como una buena respuesta a clopidogrel ( $<180$  PRU). Sin embargo, esta asociación no fue suficiente para correlacionar este fenotipo con un riesgo incrementado de eventos isquémicos, posiblemente por el reducido tamaño muestral. Además, dado el alto nivel de evidencia, estos pacientes son seguidos de forma más estrecha y la mayoría de clínicos optan por sustituir clopidogrel por otro fármaco antiagregante cuando tienen conocimiento de que los pacientes tienen un fenotipo CYP2C19 IM-PM, para evitar el riesgo de eventos isquémicos, por lo que la muestra se puede encontrar sesgada al tratarse de un estudio observacional. Esto podría explicar por qué la incidencia de eventos isquémicos fue más alta en el grupo CYP2C19 NM (15,9%) en comparación con IM-PM (10,8%) y RM-UM (2,3%).

A pesar de no haber encontrado asociación entre el fenotipo IM-PM y la incidencia de eventos isquémicos, creemos que la recomendación terapéutica del cambio de tratamiento en pacientes con síndrome coronario agudo sometidos a intervención coronaria percutánea con fenotipo IM-PM también se debe aplicar en pacientes sometidos a procesos neurointervencionistas, por todo lo mencionado previamente.

## 5.2. Influencia del alelo CYP2C19\*17

En lo que concierne a otros genotipos de *CYP2C19* la evidencia es más escasa<sup>174</sup>. Como en la mayoría de los casos clínicos se describen pacientes con la llamada “resistencia a clopidogrel”, la variante *CYP2C19*\*17 de aumento de función se investiga menos y, por tanto, hay un conocimiento más débil de las posibles repercusiones clínicas.

## V. Discusión

Se ha descrito que los pacientes portadores de *CYP2C19*\*17 tienen menor agregación plaquetaria al recibir tratamiento con clopidogrel y, por lo tanto, mayor riesgo de hemorragia <sup>88,95-97</sup>. Sin embargo, en otros estudios no ha sido posible asociar la incidencia de sangrados mayores con los distintos fenotipos metabolizadores de *CYP2C19* <sup>175</sup>. En concreto, el *CYP2C19*\*17 no se ha asociado con la incidencia de eventos clínicos <sup>156</sup>.

En nuestro estudio, los pacientes clasificados como *CYP2C19* RM-UM mostraron mayores niveles de inhibición plaquetaria ( $157,9 \pm 76,8$  PRU) y respuesta a clopidogrel que aquellos que tenían un fenotipo IM-PM ( $200,1 \pm 84,3$  PRU), pero no comparados con los pacientes NM ( $140,3 \pm 89,2$  PRU). En consonancia, observamos que la incidencia de eventos isquémicos fue significativamente menor a la esperada (9,7%) en los pacientes con fenotipo RM-UM (2,3%). De hecho, tras el análisis multivariante, este fenotipo fue un factor protector de eventos isquémicos tras una neurointervención percutánea (odds ratio=0,06, IC 95% 0,003-1,076). Este resultado contradice el de Lin *et al.*, que describieron que el alelo *CYP2C19*\*17 se asociaba con una mayor incidencia de eventos isquémicos después del tratamiento endovascular en 108 pacientes con un periodo de seguimiento de 3 meses, independientemente de la respuesta a clopidogrel. Los autores destacan que el hecho de que el alelo \*17 no se asocie con la actividad plaquetaria, y sí con la incidencia de eventos isquémicos, contrario a lo esperado, requiere de confirmación puesto que el pequeño tamaño muestral limita la aparición de eventos adversos que se pudieran correlacionar correctamente con los genotipos de *CYP2C19* <sup>134</sup>. Por lo tanto, puesto que nuestros resultados están en consonancia con lo esperado, es probable que el hallazgo de Lin *et al.* no pueda ser replicado.

Al contrario, la incidencia más alta de eventos hemorrágicos se detectó en los pacientes RM-UM (15,9%), con una frecuencia significativamente mayor a la esperada (8,3%). Además, en el análisis de supervivencia, se encontró un tiempo de inicio del evento hemorrágico significativamente menor en comparación con NM e IM-PM.

Asimismo, este fenotipo se mantuvo como un factor de riesgo para el sangrado en el análisis multivariante (odds ratio=3,6, IC 95% 1,071-12,1). Este resultado está en consonancia con lo descrito por varios autores que describen un mayor riesgo de eventos hemorrágicos en los pacientes de patología cardíaca portadores del alelo *CYP2C19*\*17<sup>88,96,98,99</sup>.

Colley y Yan publicaron una revisión sobre la implicación de *CYP2C19*\*2 en procedimientos neurointervencionistas, donde se establecía la relación de este alelo con una hiporrespuesta a clopidogrel<sup>131</sup>. Sin embargo, las implicaciones del alelo *CYP2C19*\*17 eran, hasta ahora, desconocidas en esta cohorte de pacientes. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio en asociar el fenotipo metabolizador de *CYP2C19*, basado tanto en alelos de aumento como en alelos de pérdida de función de *CYP2C19*, con resultados clínicos en una cohorte de pacientes sometidos a procedimientos neurointervencionistas. Por esta razón, sugerimos que las recomendaciones terapéuticas deberían incluir una reducción de dosis o un cambio de tratamiento también en los pacientes con fenotipo RM-UM, para prevenir el riesgo de complicaciones hemorrágicas.

### 5.3. Influencia del genotipo de *CYP2C19* y el uso de IBP

Ya se ha comentado previamente la influencia del uso concomitante de IBP durante el tratamiento con clopidogrel, debido a su actividad inhibitoria de la enzima *CYP2C19*. En nuestro estudio, la tasa de pacientes respondedores con tratamiento concomitante con IBP y fenotipo *CYP2C19* IM-PM fue sólo del 28,6%, frente al 64% en NM y 61,3% en RM-UM. En los pacientes sin tratamiento concomitante con IBP la tasa de respuesta para los mismos fenotipos fue del 55,6%, 83,3% y 45,5%, respectivamente. Es decir, tanto para los fenotipos IM-PM como NM la tasa de respuesta es llamativamente superior cuando no tomaban IBP en comparación con los pacientes que sí recibían IBP. Esto pone de manifiesto que efectivamente existe una inhibición de la enzima *CYP2C19* por parte de los IBP, ya que ante la presencia de estos el nivel de

agregometría es superior por producirse menos cantidad de metabolito activo. Llama la atención que la tasa de respuesta sea superior en pacientes RM-UM con tratamiento con IBP (61,3%) que sin tratamiento con IBP (45,5%) aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Es necesario ampliar el estudio para comprobar si el efecto de los IBP en los fenotipos RM y UM es relevante.

Teniendo esto en cuenta, Saab *et al.* propusieron un ajuste de dosis basado en los distintos genotipos de *CYP2C19* (incluyendo el genotipado de los alelos \*2, \*3 y \*17) y el uso concomitante de una larga lista de inhibidores e inductores de *CYP2C19* <sup>176</sup>. En la tabla 30 se muestra la dosis que recomiendan para los distintos genotipos de *CYP2C19* cuando el clopidogrel se administre conjuntamente con omeprazol o pantoprazol, los dos fármacos que en nuestro estudio influyen sobre la respuesta a clopidogrel. Para ambos fármacos el ajuste de dosis es similar, lo que confirma nuestros datos sobre el mismo efecto inhibitor que ejerce pantoprazol comparado con omeprazol.

**Tabla 30.** Dosis recomendada de clopidogrel en pacientes con genotipo *CYP2C19* conocido y tratamiento concomitante con omeprazol y pantoprazol

	Genotipo <i>CYP2C19</i>					
	*17/*17	*1/*17	*1/*1	*2/*17	*1/*2	*2/*2
<b>Sin IBP</b>	45 mg/d	54 mg/d	75 mg/d	86 mg/d	137 mg/d	212 mg/d
<b>Omeprazol</b>	68 mg/d	80 mg/d	104 mg/d	116 mg/d	163 mg/d	213 mg/d
<b>Pantoprazol</b>	56 mg/d	68 mg/d	90 mg/d	102 mg/d	152 mg/d	213 mg/d

Tabla adaptada de Saab *et al.* Ther Clin Risk Manag. 2015 Sep 23;11:1421-7. El ajuste de dosis recomendado es sobre una dosis de mantenimiento de clopidogrel de 75 mg/d.

Puesto que las dosis que proponen son difíciles de aplicar en la clínica, teniendo en cuenta que cada comprimido tiene una dosis de clopidogrel de 75 mg y que se administre conjuntamente con omeprazol o pantoprazol, se podrían simplificar recomendando un comprimido para los genotipos \*17/\*17 y \*1/\*17, un comprimido y medio para los genotipos \*1/\*1 y \*2/\*17, dos comprimidos para el genotipo \*1/\*2 y 3 comprimidos para el genotipo \*2/\*2. No obstante, sería necesario realizar un ensayo clínico aleatorizado donde se demuestre que el ajuste de dosis en base al genotipo de

*CYP2C19* y el uso concomitante de inhibidores/inductores mejora la respuesta a clopidogrel y reduce la incidencia de eventos adversos.

#### 5.4. Alternativa al tratamiento con clopidogrel

El CPIC publicó en 2013 una guía terapéutica basada en el genotipo de *CYP2C19* para el tratamiento con clopidogrel de síndromes coronarios agudos <sup>84</sup>. En resumen, los pacientes con fenotipo NM y RM-UM pueden tomar las dosis estándar de clopidogrel tal y como indica la ficha técnica. Por otro lado, los pacientes con fenotipo IM y PM deben recibir una terapia antiplaquetaria alternativa. Dos antagonistas del receptor P2Y<sub>12</sub> han sido aprobados en los últimos años por las agencias reguladoras para el tratamiento de pacientes con síndrome coronario agudo: el derivado de tienopiridina, prasugrel (aprobado en 2009) y la ciclopentiltiazolopirimidina, ticagrelor (aprobado en 2010/2011) <sup>76</sup>.

La alternativa al tratamiento con clopidogrel no está indicada para todos los pacientes puesto que el riesgo de hemorragia mayor es superior en pacientes con síndrome coronario agudo bajo tratamiento con prasugrel (2,4%) frente al tratamiento con clopidogrel (1,8%) <sup>177</sup>. Por otro lado, se ha comprobado que ticagrelor no es inferior a clopidogrel en la prevención de complicaciones trombóticas, pero siendo su coste mucho más elevado el uso de este fármaco sólo estaría justificado en pacientes con falta de respuesta a clopidogrel <sup>138</sup>, o con mayor riesgo de eventos.

El coste de 28 comprimidos de 75 mg de clopidogrel está en 16,81€, el coste de 56 comprimidos de 90 mg de ticagrelor está en 89,61€ (la dosis recomendada es de 90 mg dos veces al día) y el coste de 28 comprimidos de prasugrel 10 mg está en 33,41€ <sup>178</sup>. Por consiguiente, la dosis diaria de clopidogrel, ticagrelor y prasugrel se sitúa en un coste de 0,6€/día, 3,2€/día y 1,2€/día, respectivamente.

Por lo tanto, el genotipado anticipado puede ayudar a predecir qué pacientes deben recibir una terapia antiagregante alternativa a clopidogrel, para reducir al mínimo el riesgo de eventos adversos y evitar el sobre coste que supone el cambio de tratamiento

injustificado. Además, hay que tener en cuenta que ticagrelor y prasugrel no están autorizados para el tratamiento de enfermedades neurológicas <sup>139,140</sup>. De hecho, prasugrel está contraindicado en pacientes con historia de ictus o AIT <sup>139</sup>.

En nuestra población de estudio, es destacable que el 13,9% de los pacientes necesitó un cambio de tratamiento. De los 20 pacientes en los que se produjo un cambio de tratamiento, 18 (90%) recibieron ticagrelor, 1 (5%) prasugrel y 1 (5%) ácido acetilsalicílico, por lo que parece que los clínicos se decantan por el cambio a ticagrelor por un mejor perfil de seguridad.

Analizando estos datos por fenotipo, sólo al 29,7% de los pacientes CYP2C19 IM-PM se les cambió el tratamiento, aunque este porcentaje es significativamente superior al grupo NM (7,9%) y RM-UM (9,1%). Teniendo en cuenta las recomendaciones de la guías, aunque no sean para este tipo de patologías, era esperable encontrar un porcentaje superior de cambio de tratamiento en los portadores de *CYP2C19*\*2. La mayoría de los pacientes en los que se produjo un cambio de tratamiento se hizo en base a una falta de respuesta a clopidogrel (valores de agregometría muy altos). En los últimos años, y tras la evidencia científica que relaciona el alelo *CYP2C19*\*2 con una hiporespuesta a clopidogrel, los clínicos optaban por cambiar el tratamiento cuando recibían el informe farmacogenético que les notificaba un genotipo \*1/\*2 o \*2/\*2. En el último año, y tras la publicación de nuestro primer artículo <sup>179</sup>, los clínicos decidieron cambiar el tratamiento a ticagrelor en un paciente portador del genotipo \*17/\*17, para evitar el riesgo de eventos hemorrágicos.

La opción del ajuste de dosis de clopidogrel en base al genotipo y el tratamiento concomitante debe demostrar su utilidad en la prevención de eventos isquémicos y hemorrágicos antes de establecerse como una opción de tratamiento segura, puesto que, sin la evidencia de un ensayo clínico aleatorizado, el cambio de tratamiento en los pacientes con un genotipo distinto al *CYP2C19* \*1/\*1 parece la opción más fiable.

## 6. INFLUENCIA DE LAS ENZIMAS CYP450, CES1 y PON1

### 6.1. Influencia de las enzimas CYP

Como ya se ha mencionado previamente, el 15% restante tras la inactivación del 85% de clopidogrel por CES1, se transforma a metabolito activo a través de dos pasos consecutivos de oxidación mediados por las enzimas CYP y PON1. Por tanto, siendo muchas de estas enzimas bastante polimórficas, cabría esperar que polimorfismos que alteren su funcionalidad influyan sobre la respuesta a clopidogrel. Por otro lado, también existe la posibilidad de que, como son muchas las enzimas implicadas, el que falle una puede no ser relevante porque las demás reemplazan su función.

Existe cierta controversia en cuanto a la asociación de los alelos más estudiados de *CYP2C9* (\*2 y \*3) y la respuesta a clopidogrel. Algunos autores afirman que no hay una relación significativa <sup>95</sup>, mientras otros aseguran que la presencia del alelo \*3 se asocia a una mayor incidencia de trombosis del stent <sup>106</sup>. En nuestro estudio, las enzimas *CYP2C8* y *CYP2C9* no se asociaron significativamente con diferencias en la respuesta a clopidogrel. Sin embargo, llama la atención que los fenotipos de pérdida de función de ambos genes (PM-IM) sean los que presenten un valor de agregometría más bajo, puesto que cabría esperar lo contrario: una pérdida de función de una enzima metabolizadora relevante para la formación de metabolito activo se traduciría en una menor concentración de este y, por tanto, una reducción en la respuesta al fármaco. Esto mismo sucede con el resto de las enzimas CYP (*CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP3A4* y *CYP3A5*), donde no siendo significativo en ningún caso, son los sujetos con fenotipos de pérdida de función los que muestran valores de agregometría más bajos.

En lo que respecta al alelo *CYP1A2*\*1C, este se ha asociado principalmente a una reducción de la actividad de *CYP1A2*, pero también a un aumento <sup>180,181</sup>. En nuestro estudio, encontramos un valor de agregometría llamativamente inferior en el paciente con genotipo *CYP1A2* \*1C/\*1C (asignado como fenotipo PM), con fenotipo NM para *CYP2C19*. Este resultado coincide con la investigación de Cresci *et al.*, quienes describen un mayor riesgo de sangrado asociado a este alelo en pacientes

afroamericanos con infarto agudo de miocardio <sup>112</sup>. Los autores especulan que esta asociación podría estar relacionada con una respuesta incrementada a clopidogrel en los pacientes portadores del alelo *CYP1A2*\*1C <sup>112</sup>. Sin embargo, en nuestro estudio, *CYP1A2* no fue un factor relevante en el análisis multivariante. De hecho, teniendo en cuenta que sólo hemos podido encontrar un sujeto con genotipo \*1C/\*1C, este resultado necesita ser confirmado.

En cuanto a *CYP3A4*, la actividad reducida de esta enzima se ha asociado con un riesgo incrementado de trombosis del stent en pacientes con síndrome coronario agudo tratados con clopidogrel <sup>109</sup>. De hecho, existe un estudio que postula que el papel de las enzimas *CYP3A4* y *CYP3A5* en el metabolismo de clopidogrel podría ser más relevante de lo que se ha descrito con anterioridad <sup>110</sup>. Sin embargo, en nuestro estudio, *CYP3A4* y *CYP3A5* no parecen tener un papel significativo en la variabilidad en la respuesta a clopidogrel, lo que coincide con el estudio de Holmberg *et al.* donde ni *CYP3A4* ni *CYP3A5* influyeron sobre el AUC de clopidogrel o la inhibición plaquetaria en voluntarios sanos <sup>182</sup>.

Por lo tanto, en base a estos resultados, no se puede afirmar que las isoformas *CYP2C9*, *CYP2C8*, *CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP3A4* o *CYP3A5* tengan una influencia relevante en la respuesta a clopidogrel.

En lo que respecta a la incidencia de eventos adversos, observamos una ligera tendencia a una mayor incidencia de eventos de tipo isquémico en pacientes con fenotipos *CYP2C8* o *CYP2C9* PM-IM, que no fue significativa ni en el análisis univariante ni en el multivariante, por lo que un abordaje con tamaños muestrales más grandes es necesario para esclarecer si realmente hay una asociación.

### 6.2. Influencia de CES1

La enzima CES1 metaboliza el 85% de clopidogrel a metabolito inactivo. Además, el 50% del 2-oxo-clopidogrel que se forma en el primer paso oxidativo de clopidogrel



también es metabolizado por CES1 a un compuesto inactivo, por lo que la actividad de esta enzima limita en gran medida la cantidad de metabolito activo que se forma.

El polimorfismo G143E (rs71647871) de *CES1* se ha asociado previamente con una disminución de la actividad de la enzima <sup>121</sup>. De hecho, se ha descrito que los portadores del alelo mutado presentan mayores niveles de metabolito activo y, por tanto, alcanzan una mejor respuesta a clopidogrel en pacientes con enfermedad coronaria <sup>120</sup>. Nuestros resultados coinciden con lo descrito ya que encontramos una tendencia hacia un valor de agregometría más bajo en los pacientes que portaban el polimorfismo ( $59,0 \pm 21,2$  PRU) en comparación con los *wild-type* ( $165,2 \pm 86,0$  PRU), lo que podría explicarse por un aumento en la formación del metabolito activo debido a una menor funcionalidad de CES1. Sin embargo, nuestro limitado tamaño muestral no fue suficiente para encontrar resultados estadísticamente significativos, pues sólo pudimos encontrar dos pacientes portadores del polimorfismo. Además, ambos tenían un genotipo *CYP2C19* \*1/\*17, que podría haber contribuido a reducir el valor de agregometría. Es necesario realizar estudios adicionales con tamaños de muestra más grandes para confirmar si realmente existe una asociación, puesto que en nuestro estudio la diferencia en la agregometría es llamativa.

### 6.3. Influencia de PON1

PON1 participa en el segundo paso oxidativo, transformando 2-oxo-clopidogrel en su metabolito activo. Se ha descrito que el alelo T del polimorfismo en *PON1* Q192R (rs662) condiciona la formación de metabolito activo <sup>75</sup>. En nuestro estudio, observamos que los pacientes portadores de alelos defectivos de PON1 (categorizados como PM e IM) mostraban cierta tendencia hacia un valor de agregometría superior ( $165,3 \pm 86,6$  PRU en PM y  $164,1 \pm 86,3$  PRU en IM) que los NM ( $130,2 \pm 90,6$  PRU), aunque esto no alcanzó la significación estadística. Nuestros resultados concuerdan con un estudio de Verschuren *et al.* donde describen que los pacientes portadores del alelo no funcional de Q192R tienen menores niveles de metabolito activo y, por

consiguiente, una peor respuesta a clopidogrel, así como un riesgo aumentado de eventos isquémicos <sup>183</sup>. En nuestro estudio la incidencia de eventos isquémicos fue superior en el grupo PM (13,2%) comparado con IM y NM (0%), pero no fue suficiente para resultar estadísticamente significativo.

De hecho, existe controversia sobre si clopidogrel es un sustrato de PON1, ya que otros autores afirman que no hay relación entre el polimorfismo Q192R y diferencias en la respuesta farmacológica y clínica de clopidogrel <sup>184,185</sup>. Se necesitan más estudios para esclarecer la influencia de PON1 en el tratamiento con clopidogrel.

### 7. INFLUENCIA DEL TRANSPORTADOR GLICOPROTEÍNA-P

Los niveles de expresión del transportador P-gp podrían afectar a la cantidad de fármaco que se expulsa a la luz intestinal y, por tanto, alterar la biodisponibilidad oral de clopidogrel.

Taubert *et al.* describieron menores niveles de clopidogrel y su metabolito en pacientes portadores del genotipo *ABCB1* C3435T T/T, probablemente por una expresión aumentada del transportador P-gp <sup>71</sup>. En contraste, nuestros resultados sugieren que los pacientes que portan alelos mutados de los polimorfismos C3435T, C1236T o G2677T/A tienen una expresión reducida de P-gp, puesto que encontramos una mejor respuesta en pacientes portadores del haplotipo mutado de *ABCB1*. Esto podría explicarse por las mayores concentraciones de clopidogrel y su metabolito, ya que la bomba de flujo estaría funcionando de manera ineficiente. Algunos estudios relacionan el polimorfismo de *ABCB1* más estudiado, C3435T, con una expresión reducida de P-gp en portadores del alelo minoritario <sup>124-127</sup>. Además, algunos estudios *in vitro* asocian el alelo minoritario T con una alteración en el plegamiento de la proteína y una reducción de su actividad <sup>186</sup>. De hecho, si los alelos minoritarios se asocian con una funcionalidad reducida del transportador, se espera que estos pacientes muestren concentraciones más altas de fármacos sustrato de P-gp, como

resultado de una menor eliminación. Por esta razón, la absorción de clopidogrel puede verse influida por polimorfismos en *ABCB1*.

*ABCB1* no se asoció significativamente con los eventos de tipo isquémico y/o hemorrágico, aunque sí se observó una tendencia en los sujetos con haplotipo mutado a tener menor incidencia de eventos isquémicos (3,7%) en comparación con los *wild-type* y heterocigotos (13,3% y 12%, respectivamente), lo cual iría en consonancia con una mejor respuesta en los pacientes con haplotipo mutado. Esto requiere ser confirmado en estudios con más pacientes.

## 8. INFLUENCIA DEL RECEPTOR P2Y<sub>12</sub>

Como *P2RY12* es el gen que codifica el receptor diana de clopidogrel, P2Y<sub>12</sub>, algunos polimorfismos en el mismo podrían alterar la respuesta al fármaco. En concreto, los polimorfismos rs10935838, rs2046934, rs5853517 y rs6809699, se han asociado con una mayor reactividad plaquetaria<sup>129,130</sup>, aunque estas asociaciones no se han replicado y el nivel de evidencia es bajo. En nuestro estudio encontramos una asociación en el genotipo heterocigoto del rs9859552 con un valor de agregometría más alto ( $202,0 \pm 88,9$  PRU) y una menor tasa de respuesta (31,6% frente al 62% en *wild-type* y 85,7% en mutados). Este hecho necesita ser confirmado puesto que los dos otros genotipos homocigotos mostraban valores de agregometría similares ( $149,3 \pm 83,4$  PRU en *wild-type* y  $144,0 \pm 45,2$  PRU en mutados), por lo que no es fácil distinguir cuál es el alelo causante del aumento en el valor de agregometría. En cuanto a la relación del gen con la incidencia de eventos adversos comprobamos que el porcentaje de eventos hemorrágicos fue superior en el genotipo T/T del rs6801273 (16,7%) en comparación con C/C (0%) y C/T (4,5%), aunque el hecho de que la mitad de estos pacientes fueran CYP2C19 RM-UM puede haber influido en esta asociación. Además, estas asociaciones se pierden en el análisis multivariante, puesto que son otros factores los que influyen en la respuesta a clopidogrel.

En cuanto a los haplotipos más definidos de *P2RY12*, que incluyen los polimorfismos rs10935838, rs2046934, rs5853517 y rs6809699, no encontramos una asociación significativa con la respuesta a clopidogrel. Estos resultados coinciden con los de Giusti *et al.*<sup>91</sup> y Cuisset *et al.*<sup>187</sup> que demostraron que el polimorfismo rs2046934 no se asocia con la respuesta a clopidogrel en pacientes con síndrome coronario agudo. Además, Simon *et al.* describieron una falta de asociación entre los polimorfismos rs16846673, rs6809699 y rs6785930 y el riesgo de eventos adversos cardiovasculares en pacientes con infarto agudo de miocardio tratados con clopidogrel<sup>123</sup>.

### 9. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Nuestra principal limitación es la imposibilidad de medir las concentraciones de clopidogrel y su metabolito activo, que además es altamente inestable<sup>188</sup>. Contar con estos datos habría sido útil para correlacionar los niveles plasmáticos con el valor de agregometría de los pacientes, el desenlace clínico y el efecto de los polimorfismos sobre estas variables.

Además, el limitado tamaño muestral no nos permitió encontrar más pacientes con algunos alelos con frecuencias bajas que podrían estar relacionados con el metabolismo de clopidogrel, como los polimorfismos en *CES1* o el alelo *CYP2C19\*2*, donde pudimos encontrar sólo 2 sujetos portadores homocigotos.

Por otra parte, al tratarse de un estudio de genes candidatos, existe el riesgo de que algún otro gen o alguna variante rara que no hayan sido analizados y/o detectados influyan sobre la respuesta a clopidogrel y no lo hayamos podido describir.

Asimismo, el hecho de que el estudio tenga un diseño observacional retrospectivo puede haber sesgado los resultados en cuanto a la asociación entre el alelo *CYP2C19\*2* y la incidencia de eventos isquémicos. Esto es así porque al tratarse de un estudio observacional, la primera parte de la muestra quizá sí refleje una situación sin intervención en lo que a los polimorfismos de *CYP2C19* y los eventos clínicos se refiere. Sin embargo, a raíz de la evidencia científica los clínicos comenzaron a cambiar

el tratamiento con clopidogrel a otro antiagregante cuando los pacientes portaban el *CYP2C19*\*2, de modo que se interrumpía el tratamiento y el seguimiento de clopidogrel, no pudiendo identificar los eventos adversos de tipo isquémico que pudieran haberse producido de continuar el tratamiento.

Finalmente, como cualquier estudio observacional, existe la limitación de los factores de confusión que pudieran darse: datos mal recogidos, datos insuficientes (sesgo de reporte) y el hecho de que en algunas ocasiones no permiten hacer comparaciones entre grupos por no poder alcanzar un tamaño muestral suficiente en todos ellos.

## 10. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Este estudio debe ser ampliado con un tamaño muestral superior, para poder establecer correlaciones significativas que permitan el diseño de un algoritmo de tratamiento basado en el fenotipo de los pacientes, tratamientos concomitantes y demás factores a tener en cuenta tales como la edad y el sexo.

Porteriormente, sería recomendable la realización de un ensayo clínico aleatorizado con tres ramas de tratamiento: una en la que los pacientes sean tratados de acuerdo a la práctica clínica habitual, sin información farmacogenética disponible, donde las decisiones de cambio de tratamiento o ajustes de dosis se hagan de acuerdo al criterio del clínico; otra rama de tratamiento donde el paciente sea genotipado previo al inicio del tratamiento con clopidogrel, para que el ajuste del tratamiento a prescribir y las dosis a administrar sean guiadas por la información farmacogenética (principalmente *CYP2C19*) y el uso de medicación concomitante, aplicando el algoritmo de tratamiento. Por último, sería útil una tercera rama de tratamiento donde se administre alguna de las alternativas al tratamiento con clopidogrel (por ejemplo ticagrelor) para así comprobar si el tratamiento guiado por la farmacogenética, donde sólo aquellos pacientes que no vayan a responder adecuadamente a clopidogrel reciban un tratamiento alternativo, es coste-efectivo con respecto a la administración de otro antiagregante a todos los pacientes, con independencia de su genotipo.

Un análisis farmacoeconómico ayudaría a comprobar si la farmacogenética es una herramienta coste-efectiva, en la que se compensa el coste de la técnica con el ahorro en el desarrollo de acontecimientos adversos posteriores y los costes que estos suponen. Es decir, si el ahorro que produce su implementación en la práctica clínica habitual (por la reducción de RAM y los costes directos e indirectos de las hospitalizaciones) es superior al coste que conlleva su implementación y desarrollo en la práctica asistencial.

De esta manera, se podría comprobar si esta individualización terapéutica reduce la incidencia de eventos adversos, mejora la respuesta a clopidogrel y evita un sobre coste al sistema nacional de salud. El tamaño muestral debería ser grande para poder encontrar sujetos portadores de alelos minoritarios de SNP de baja frecuencia, lo que hace necesaria la colaboración entre grupos de investigación de varios centros.

Como última reflexión, debemos destacar que hemos percibido tras la revisión de los datos en las historias clínicas de los pacientes que, conforme avanza el conocimiento sobre la influencia de CYP2C19 en el tratamiento con clopidogrel, cada vez se utiliza más el informe realizado desde la Unidad de Farmacogenética. Es decir, la implementación de los resultados farmacogenéticos en la clínica, aunque difícil, es posible. A raíz de la publicación conjunta en 2018 entre el Servicio de Farmacología Clínica y el Servicio de Radiología, con los primeros 121 pacientes, incluida en el anexo I (Saiz-Rodríguez M, *et al.* Clin Pharmacol Ther. 2019 Mar;105(3):661-671. doi:10.1002/cpt.1067. Epub 2018 Apr 17.), los radiólogos del Hospital Universitario de La Princesa son más conscientes de la necesidad de incluir el genotipo como una variable más a tener en cuenta en la prescripción. Por tanto, consideramos que es necesario un trabajo en equipo multidisciplinar para la elaboración de guías terapéuticas que los clínicos puedan entender y aplicar, para que la información farmacogenética pueda ser aplicada por quién realmente prescribe.

En nuestro Servicio de Farmacología Clínica se va a desarrollar próximamente una Consulta de Farmacogenética donde se pretende implementar un modelo de genotipado de un grupo de 50 genes (120 SNP) de utilidad en farmacogenética, basándonos en las guías publicadas por el CPIC. Por ejemplo, se incluirán las principales enzimas *CYP* (*1A2*, *2B6*, *2C9*, *2C8*, *2C19*, *2D6*, *3A4*, *3A5*), *TPMT* y *NUDT15* para el tratamiento con tiopurinas, *DPYD* para el tratamiento con fluoropirimidinas, *HCP5* como biomarcador en perfecto desequilibrio de ligamiento con el *HLA-B\*5701* para el tratamiento con abacavir, *COMT* y *OPRM1* para el tratamiento con opioides, *HTR2A* y *HTR2B* para el tratamiento con antipsicóticos y antidepresivos, etc. Nuestra idea es dar soporte a los facultativos que así lo deseen y promover la implementación de esta información en Servicios donde aún no se solicitan estudios.



## **VI. CONCLUSIONES**



1. Nuestros resultados confirman que CYP2C19 es la enzima más relevante en la formación de metabolito activo de clopidogrel.
2. El alelo *CYP2C19*\*2 se asocia con una hiporrespuesta a clopidogrel en pacientes tras una neurointervención percutánea.
3. El alelo *CYP2C19*\*17 es un factor protector para la incidencia de eventos isquémicos pero un factor de riesgo para la incidencia de eventos hemorrágicos tras el tratamiento con clopidogrel en pacientes con estenosis carotídea o aneurisma cerebral.
4. El haplotipo mutado de *ABCB1* es un factor predictor de mejor respuesta a clopidogrel, por lo que la glicoproteína-P parece desempeñar un papel relevante en su absorción y/o distribución.
5. Los sujetos portadores del polimorfismo G143E de *CES1* presentan un aumento del efecto antiagregante, sugiriendo una mayor formación de metabolito activo.
6. Los polimorfismos en otras enzimas del *CYP450*, *PON1* o *P2RY12* no parecen influir en el efecto del clopidogrel tras una neurointervención.
7. El uso de IBP disminuye la respuesta a clopidogrel especialmente en pacientes portadores de un alelo *CYP2C19*\*2 o pacientes con genotipo *wild-type*.
8. Como conclusión final podemos recomendar:
  - ❖ El genotipado anticipado de rutina de *CYP2C19* para todos los pacientes que vayan a recibir tratamiento con clopidogrel.
  - ❖ La prescripción de un antiagregante diferente al clopidogrel en pacientes portadores de los alelos *CYP2C19*\*2 o \*17.
  - ❖ Evitar el uso concomitante de IBP y clopidogrel.



## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Spear BB, Heath-Chiozzi M, Huff J. Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol Med*. 2001 May;7(5):201–4.
2. Budnitz DS, Pollock DA, Weidenbach KN, Mendelsohn AB, Schroeder TJ, Annest JL. National surveillance of emergency department visits for outpatient adverse drug events. *JAMA*. 2006 Oct 18;296(15):1858–66.
3. Gurwitz D, Motulsky AG. 'Drug reactions, enzymes, and biochemical genetics': 50 years later. *Pharmacogenomics*. 2007 Nov;8(11):1479–84.
4. Pirmohamed M, James S, Meakin S, Green C, Scott AK, Walley TJ, et al. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *BMJ*. 2004 Jul 3;329(7456):15–9.
5. Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem*. 2008 Nov;392(6):1093–108.
6. Xing J, Watkins WS, Shlien A, Walker E, Huff CD, Witherspoon DJ, et al. Toward a more uniform sampling of human genetic diversity: a survey of worldwide populations by high-density genotyping. *Genomics*. 2010 Oct;96(4):199–210.
7. Vogel, F. Moderne Probleme der Humangenetik. *Ergebn. Inn. Med. Kinderheilkd*. 12, 52–125 (1959).
8. Meyer UA. Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat Rev Genet*. 2004 Sep;5(9):669–76.
9. Motulsky AG. Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. *J Am Med Assoc*. 1957 Oct 19;165(7):835–7.
10. Weinshilboum RM, Wang L. Pharmacogenomics: Precision Medicine and Drug Response. *Mayo Clin Proc*. 2017 Nov;92(11):1711–22.
11. Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW, et al. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature*. 1988 Feb 4;331(6155):442–6.
12. Broly F, Gaedigk A, Heim M, Eichelbaum M, Morike K, Meyer UA. Debrisoquine/sparteine hydroxylation genotype and phenotype: analysis of common mutations and alleles of CYP2D6 in a European population. *DNA Cell Biol*. 1991 Oct;10(8):545–58.
13. Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet*. 1980 Sep;32(5):651–62.
14. Lennard L, Van Loon JA, Weinshilboum RM. Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Clin Pharmacol Ther*. 1989 Aug;46(2):149–54.
15. Stocco G, Crews KR, Evans WE. Genetic polymorphism of inosine-triphosphate-pyrophosphatase influences mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment

- of acute lymphoblastic leukemia individualized for thiopurine-S-methyl-transferase status. *Expert Opin Drug Saf.* 2010 Jan;9(1):23–37.
16. Mallal S, Nolan D, Witt C, Masel G, Martin AM, Moore C, et al. Association between presence of HLA-B\*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet Lond Engl.* 2002 Mar 2;359(9308):727–32.
17. Hetherington S, Hughes AR, Mosteller M, Shortino D, Baker KL, Spreen W, et al. Genetic variations in HLA-B region and hypersensitivity reactions to abacavir. *Lancet Lond Engl.* 2002 Mar 30;359(9312):1121–2.
18. Mallal S, Phillips E, Carosi G, Molina J-M, Workman C, Tomazic J, et al. HLA-B\*5701 screening for hypersensitivity to abacavir. *N Engl J Med.* 2008 Feb 7;358(6):568–79.
19. Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios (AEMPS). Ficha técnica del abacavir. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Revisada: mayo de 2018.
20. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet.* 2006 Feb;7(2):85–97.
21. 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015 Oct 1;526(7571):68–74.
22. Buchanan CC, Torstenson ES, Bush WS, Ritchie MD. A comparison of cataloged variation between International HapMap Consortium and 1000 Genomes Project data. *J Am Med Inform Assoc.* 2012 Mar;19(2):289–94.
23. Porter TD, Coon MJ. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem.* 1991 Jul 25;266(21):13469–72.
24. Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003;43:149–73.
25. McGraw J, Waller D. Cytochrome P450 variations in different ethnic populations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2012 Mar;8(3):371–82.
26. Nelson DR. The cytochrome p450 homepage. *Hum Genomics.* 2009 Oct;4(1):59–65.
27. Zanger UM, Klein K, Thomas M, Rieger JK, Tremmel R, Kandel BA, et al. Genetics, epigenetics, and regulation of drug-metabolizing cytochrome p450 enzymes. *Clin Pharmacol Ther.* 2014 Mar;95(3):258–61.
28. Wienkers LC, Heath TG. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nat Rev Drug Discov.* 2005 Oct;4(10):825–33.
29. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med.* 2006;57:119–37.
30. Gardiner SJ, Begg EJ. Pharmacogenetics, drug-metabolizing enzymes, and clinical practice. *Pharmacol Rev.* 2006 Sep;58(3):521–90.

31. International Transporter Consortium, Giacomini KM, Huang S-M, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KLR, et al. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Mar;9(3):215–36.
32. Hillgren KM, Keppler D, Zur AA, Giacomini KM, Stieger B, Cass CE, et al. Emerging transporters of clinical importance: an update from the International Transporter Consortium. *Clin Pharmacol Ther*. 2013 Jul;94(1):52–63.
33. Schinkel AH. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol*. 1997 Jun;8(3):161–70.
34. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. 1990 Sep;38(9):1277–87.
35. Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*. 1994 May 20;77(4):491–502.
36. Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ, et al. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 15;94(8):4028–33.
37. Li Y-H, Wang Y-H, Li Y, Yang L. MDR1 gene polymorphisms and clinical relevance. *Yi Chuan Xue Bao*. 2006 Feb;33(2):93–104.
38. Motsinger-Reif AA, Jorgenson E, Relling MV, Kroetz DL, Weinshilboum R, Cox NJ, et al. Genome-wide association studies in pharmacogenomics: successes and lessons. *Pharmacogenet Genomics*. 2013 Aug;23(8):383–94.
39. National Research Council (US) Committee on A Framework for Developing a New Taxonomy of Disease. Toward Precision Medicine: Building a Knowledge Network for Biomedical Research and a New Taxonomy of Disease [Internet]. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011 [cited 2017 Apr 17]. (The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK91503/>
40. Propuesta de Recomendaciones para una Estrategia Estatal de Medicina Personalizada de Precisión. Fundación Instituto Roche. 2017. Disponible en: [https://www.instituto-roche.es/static/pdfs/Propuesta\\_de\\_Recomendaciones\\_MPP.pdf](https://www.instituto-roche.es/static/pdfs/Propuesta_de_Recomendaciones_MPP.pdf).
41. Johnson JA, Burkley BM, Langaee TY, Clare-Salzler MJ, Klein TE, Altman RB. Implementing personalized medicine: development of a cost-effective customized pharmacogenetics genotyping array. *Clin Pharmacol Ther*. 2012 Oct;92(4):437–9.
42. Borobia AM, Dapia I, Tong HY, Arias P, Muñoz M, Tenorio J, et al. Clinical Implementation of Pharmacogenetic Testing in a Hospital of the Spanish National Health System: Strategy and Experience Over 3 Years. *Clin Transl Sci*. 2018 Mar;11(2):189–99.
43. Rasmussen-Torvik LJ, Stallings SC, Gordon AS, Almoguera B, Basford MA, Bielinski SJ, et al. Design and anticipated outcomes of the eMERGE-PGx project: a multicenter pilot for

- preemptive pharmacogenomics in electronic health record systems. *Clin Pharmacol Ther.* 2014 Oct;96(4):482–9.
44. Qureshi AI. Endovascular treatment of cerebrovascular diseases and intracranial neoplasms. *The Lancet.* 2004 Mar;363(9411):804–13.
45. Adams HP, del Zoppo G, Alberts MJ, Bhatt DL, Brass L, Furlan A, et al. Guidelines for the Early Management of Adults With Ischemic Stroke: A Guideline From the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: The American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Circulation.* 2007 May 22;115(20):e478–534.
46. Komotar RJ, Mocco J, Solomon RA. GUIDELINES FOR THE SURGICAL TREATMENT OF UNRUPTURED INTRACRANIAL ANEURYSMS. *Neurosurgery.* 2008 Jan;62(1):183–94.
47. Arikan F, Fernández-Alén J. Criterios para la formación y capacitación en Neurorradiología Intervencionista-Neurointervencionismo, acordados por el Grupo Español de Neurorradiología Intervencionista (GENI), la Sociedad Española de Neurorradiología (SENR) y los grupos expertos en patología vascular de las sociedades españolas de Neurocirugía (SENEC) y Neurología (SEN). Bases para la obtención de una acreditación de centros y especialistas en Neurorradiología Intervencionista-Neurointervencionismo. *Neurocirugía.* 2016 Jan;27(1):41–8.
48. Grupo Español de Neurorradiología Intervencionista. Información sobre patologías y tratamientos. Disponible en: <https://neurointervencionismo.es/> Último acceso: 12 de julio de 2018.
49. Secondary prevention of vascular disease by prolonged antiplatelet treatment. Antiplatelet Trialists' Collaboration. *Br Med J Clin Res Ed.* 1988 Jan 30;296(6618):320–31.
50. Herbert J-M, Savi P. P2Y12, a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel. *Semin Vasc Med.* 2003 May;3(2):113–22.
51. Montinari MR, Minelli S, De Caterina R. The first 3500 years of aspirin history from its roots - A concise summary. *Vascul Pharmacol.* 2018 Nov 1;
52. Gerhardt C. Untersuchungen über die wasserfreien organischen Säuren. *Liebig's Annalen* 1853;87:149.
53. Fiorella D. Anti-thrombotic medications for the neurointerventionist: aspirin and clopidogrel. *J Neurointerventional Surg.* 2010 Mar;2(1):44–9.
54. Schafer AI. Antiplatelet therapy. *Am J Med.* 1996 Aug;101(2):199–209.
55. Hass WK, Easton JD, Adams HP, Pryse-Phillips W, Molony BA, Anderson S, et al. A randomized trial comparing ticlopidine hydrochloride with aspirin for the prevention of stroke in high-risk patients. Ticlopidine Aspirin Stroke Study Group. *N Engl J Med.* 1989 Aug 24;321(8):501–7.

56. Gent M, Blakely JA, Easton JD, Ellis DJ, Hachinski VC, Harbison JW, et al. The Canadian American Ticlopidine Study (CATS) in thromboembolic stroke. *Lancet Lond Engl*. 1989 Jun 3;1(8649):1215–20.
57. Janzon L, Bergqvist D, Boberg J, Boberg M, Eriksson I, Lindgärde F, et al. Prevention of myocardial infarction and stroke in patients with intermittent claudication; effects of ticlopidine. Results from STIMS, the Swedish Ticlopidine Multicentre Study. *J Intern Med*. 1990 May;227(5):301–8.
58. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet Lond Engl*. 1996 Nov 16;348(9038):1329–39.
59. Herbert JM, Frehel D, Vallée E, et al. Clopidogrel, a novel antiplatelet and antithrombotic agent. *Cardiovasc Drug Rev* 1993;11:180–198.
60. Quinn MJ, Fitzgerald DJ. Ticlopidine and clopidogrel. *Circulation*. 1999 Oct 12;100(15):1667–72.
61. Levine GN, Bates ER, Blankenship JC, Bailey SR, Bittl JA, Cercek B, et al. 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. *Circulation*. 2011 Dec 6;124(23):2574–609.
62. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK, et al. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med*. 2001 Aug 16;345(7):494–502.
63. Kahner BN, Shankar H, Murugappan S, Prasad GL, Kunapuli SP. Nucleotide receptor signaling in platelets. *J Thromb Haemost JTH*. 2006 Nov;4(11):2317–26.
64. Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, Combalbert J, Picard C, Maffrand JP, et al. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost*. 2000 Nov;84(5):891–6.
65. Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios (AEMPS). Ficha técnica del clopidogrel. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Revisada: octubre de 2016.
66. Nguyen TA, Diodati JG, Pharand C. Resistance to clopidogrel: a review of the evidence. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Apr 19;45(8):1157–64.
67. Ferri N, Corsini A, Bellosta S. Pharmacology of the new P2Y<sub>12</sub> receptor inhibitors: insights on pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. *Drugs*. 2013 Oct;73(15):1681–709.
68. Floyd CN, Passacuale G, Ferro A. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of platelet adenosine diphosphate receptor antagonists and their clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 2012 Jul 1;51(7):429–42.



## Bibliográfia

69. Small DS, Wrishko RE, Ernest CS, Ni L, Winters KJ, Farid NA, et al. Prasugrel pharmacokinetics and pharmacodynamics in subjects with moderate renal impairment and end-stage renal disease. *J Clin Pharm Ther*. 2009 Oct;34(5):585–94.
70. Farid NA, Small DS, Payne CD, Jakubowski JA, Brandt JT, Li YG, et al. Effect of atorvastatin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of prasugrel and clopidogrel in healthy subjects. *Pharmacotherapy*. 2008 Dec;28(12):1483–94.
71. Taubert D, von Beckerath N, Grimberg G, Lazar A, Jung N, Goeser T, et al. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther*. 2006 Nov;80(5):486–501.
72. Cairns JA, Eikelboom J. Clopidogrel resistance: more grist for the mill. *J Am Coll Cardiol*. 2008 May 20;51(20):1935–7.
73. Lins R, Broekhuysen J, Necciari J, Deroubaix X. Pharmacokinetic profile of <sup>14</sup>C-labeled clopidogrel. *Semin Thromb Hemost*. 1999;25 Suppl 2:29–33.
74. Sangkuhl K, Klein TE, Altman RB. Clopidogrel pathway. *Pharmacogenet Genomics*. 2010 Jul;20(7):463–5.
75. Bouman HJ, Schömig E, van Werkum JW, Velder J, Hackeng CM, Hirschhäuser C, et al. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med*. 2011 Jan;17(1):110–6.
76. Trenk D, Hochholzer W. Genetics of platelet inhibitor treatment. *Br J Clin Pharmacol*. 2014 Apr;77(4):642–53.
77. Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, Malinin AI, Bhatt DL, Topol EJ. Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Jan;45(2):246–51.
78. Gurbel PA, Bliden KP, Guyer K, Cho PW, Zaman KA, Kreutz RP, et al. Platelet reactivity in patients and recurrent events post-stenting: results of the PREPARE POST-STENTING Study. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Nov 15;46(10):1820–6.
79. Bonello L, Tantry US, Marcucci R, Blindt R, Angiolillo DJ, Becker R, et al. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Sep 14;56(12):919–33.
80. Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, Shechter M, Beinart R, Bienart R, et al. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004 Jun 29;109(25):3171–5.
81. Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, et al. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. 2010 Jan;38(1):92–9.
82. The Pharmacogene Variation (PharmVar) Consortium. CYP2C19 allele nomenclature. Last accessed July 27, 2018. Available from: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2C19>.
83. Lee S-J. Clinical Application of CYP2C19 Pharmacogenetics Toward More Personalized Medicine. *Front Genet*. 2012;3:318.



84. Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, Hulot J-S, Mega JL, Roden DM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther.* 2013 Sep;94(3):317–23.
85. de Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Nakamura K, Meyer UA, Goldstein JA. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J Biol Chem.* 1994 Jun 3;269(22):15419–22.
86. Sim SC, Risinger C, Dahl M-L, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, et al. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin Pharmacol Ther.* 2006 Jan;79(1):103–13.
87. Caudle KE, Dunnenberger HM, Freimuth RR, Peterson JF, Burlison JD, Whirl-Carrillo M, et al. Standardizing terms for clinical pharmacogenetic test results: consensus terms from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2017 Feb;19(2):215–23.
88. Sibbing D, Gebhard D, Koch W, Braun S, Stegherr J, Morath T, et al. Isolated and interactive impact of common CYP2C19 genetic variants on the antiplatelet effect of chronic clopidogrel therapy. *J Thromb Haemost JTH.* 2010 Aug;8(8):1685–93.
89. Li-Wan-Po A, Girard T, Farndon P, Cooley C, Lithgow J. Pharmacogenetics of CYP2C19: functional and clinical implications of a new variant CYP2C19\*17. *Br J Clin Pharmacol.* 2010 Mar;69(3):222–30.
90. Mega JL, Simon T, Collet J-P, Anderson JL, Antman EM, Bliden K, et al. Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. *JAMA.* 2010 Oct 27;304(16):1821–30.
91. Giusti B, Gori AM, Marcucci R, Saracini C, Sestini I, Panicia R, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism, but not CYP3A4 IVS10 + 12G/A and P2Y12 T744C polymorphisms, is associated with response variability to dual antiplatelet treatment in high-risk vascular patients. *Pharmacogenet Genomics.* 2007 Dec;17(12):1057–64.
92. Zabalza M, Subirana I, Sala J, Lluís-Ganella C, Lucas G, Tomás M, et al. Meta-analyses of the association between cytochrome CYP2C19 loss- and gain-of-function polymorphisms and cardiovascular outcomes in patients with coronary artery disease treated with clopidogrel. *Heart.* 2012 Jan 15;98(2):100–8.
93. Sibbing D, Stegherr J, Latz W, Koch W, Mehilli J, Dörrler K, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and stent thrombosis following percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J.* 2009 Apr;30(8):916–22.
94. Cavallari LH, Lee CR, Beitelshes AL, Cooper-DeHoff RM, Duarte JD, Voora D, et al. Multisite Investigation of Outcomes With Implementation of CYP2C19 Genotype-Guided Antiplatelet Therapy After Percutaneous Coronary Intervention. *JACC Cardiovasc Interv.* 2018 Jan 22;11(2):181–91.
95. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med.* 2009 Jan 22;360(4):354–62.

## Bibliografía

96. Frère C, Cuisset T, Gaborit B, Alessi M-C, Hulot J-S. The CYP2C19\*17 allele is associated with better platelet response to clopidogrel in patients admitted for non-ST acute coronary syndrome. *J Thromb Haemost JTH*. 2009 Aug;7(8):1409–11.
97. Tiroch KA, Sibbing D, Koch W, Roosen-Runge T, Mehilli J, Schömig A, et al. Protective effect of the CYP2C19 \*17 polymorphism with increased activation of clopidogrel on cardiovascular events. *Am Heart J*. 2010 Sep;160(3):506–12.
98. Sibbing D, Koch W, Gebhard D, Schuster T, Braun S, Stegherr J, et al. Cytochrome 2C19\*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation*. 2010 Feb 2;121(4):512–8.
99. Li Y, Tang H-L, Hu Y-F, Xie H-G. The gain-of-function variant allele CYP2C19\*17: a double-edged sword between thrombosis and bleeding in clopidogrel-treated patients. *J Thromb Haemost JTH*. 2012 Feb;10(2):199–206.
100. Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, et al. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA*. 2009 Aug 26;302(8):849–57.
101. Sorich MJ, Polasek TM, Wiese MD. Systematic review and meta-analysis of the association between cytochrome P450 2C19 genotype and bleeding. *Thromb Haemost*. 2012 Jul;108(1):199–200.
102. Lewis JP, Stephens SH, Horenstein RB, O'Connell JR, Ryan K, Peer CJ, et al. The CYP2C19\*17 variant is not independently associated with clopidogrel response. *J Thromb Haemost JTH*. 2013 Sep;11(9):1640–6.
103. Swen JJ, Nijenhuis M, de Boer A, Grandia L, Maitland-van der Zee AH, Mulder H, et al. Pharmacogenetics: from bench to byte--an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther*. 2011 May;89(5):662–73.
104. Hulot J-S, Hajjar R, Montalescot G. Clopidogrel and CYP2C19 testing: ready for clinical prime time? *Clin Chem*. 2012 Jan;58(1):154–7.
105. The Pharmacogene Variation (PharmVar) Consortium. [Internet]. Available from: <https://www.pharmvar.org>
106. Harmsze A, van Werkum JW, Bouman HJ, Ruven HJ, Breet NJ, Ten Berg JM, et al. Besides CYP2C19\*2, the variant allele CYP2C9\*3 is associated with higher on-clopidogrel platelet reactivity in patients on dual antiplatelet therapy undergoing elective coronary stent implantation. *Pharmacogenet Genomics*. 2010 Jan;20(1):18–25.
107. Apellániz-Ruiz M, Inglada-Pérez L, Naranjo MEG, Sánchez L, Mancikova V, Currás-Freixes M, et al. High frequency and founder effect of the CYP3A4\*20 loss-of-function allele in the Spanish population classifies CYP3A4 as a polymorphic enzyme. *Pharmacogenomics J*. 2015 Jun;15(3):288–92.
108. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet*. 2001 Apr;27(4):383–91.

109. Rytkin E, Mirzaev KB, Grishina EA, Smirnov VV, Ryzhikova KA, Sozaeva ZA, et al. DoCYP2C19andABCB1gene polymorphisms and low CYP3A4 isoenzyme activity have an impact on stent implantation complications in acute coronary syndrome patients? *Pharmacogenomics Pers Med*. 2017;10:243–5.
110. Ford NF. The Metabolism of Clopidogrel: CYP2C19 Is a Minor Pathway. *J Clin Pharmacol*. 2016;56(12):1474–83.
111. Viviani Anselmi C, Briguori C, Roncarati R, Papa L, Visconti G, Focaccio A, et al. Routine assessment of on-clopidogrel platelet reactivity and gene polymorphisms in predicting clinical outcome following drug-eluting stent implantation in patients with stable coronary artery disease. *JACC Cardiovasc Interv*. 2013 Nov;6(11):1166–75.
112. Cresci S, Depta JP, Lenzini PA, Li AY, Lanfear DE, Province MA, et al. Cytochrome p450 gene variants, race, and mortality among clopidogrel-treated patients after acute myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014 Jun;7(3):277–86.
113. González A, Moniche F, Cayuela A, García-Lozano JR, Torrecillas F, Escudero-Martínez I, et al. Effect of CYP2C19 Polymorphisms on the Platelet Response to Clopidogrel and Influence on the Effect of High Versus Standard Dose Clopidogrel in Carotid Artery Stenting. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg*. 2016 Feb;51(2):175–86.
114. Saydam F, Değirmenci İ, Birdane A, Özdemir M, Ulus T, Özbayer C, et al. The CYP2C19\*2 and CYP2C19\*17 Polymorphisms play a Vital Role in Clopidogrel Responsiveness after Percutaneous Coronary Intervention: A Pharmacogenomics Study. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017 Jul;121(1):29–36.
115. Najafi M, Gohari LH, Firoozrai M. Paraoxonase 1 gene promoter polymorphisms are associated with the extent of stenosis in coronary arteries. *Thromb Res*. 2009;123(3):503–10.
116. Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet*. 1993 Jan;3(1):73–6.
117. Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanché H, Passa P, Froguel P, et al. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest*. 1997 Jan 1;99(1):62–6.
118. Costa LG, Cole TB, Vitalone A, Furlong CE. Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2005 Feb;352(1–2):37–47.
119. Marsh S, Xiao M, Yu J, Ahluwalia R, Minton M, Freimuth RR, et al. Pharmacogenomic assessment of carboxylesterases 1 and 2. *Genomics*. 2004 Oct;84(4):661–8.
120. Lewis JP, Horenstein RB, Ryan K, O’Connell JR, Gibson Q, Mitchell BD, et al. The functional G143E variant of carboxylesterase 1 is associated with increased clopidogrel active metabolite levels and greater clopidogrel response. *Pharmacogenet Genomics*. 2013 Jan;23(1):1–8.

## Bibliografia

121. Zhu H-J, Patrick KS, Yuan H-J, Wang J-S, Donovan JL, DeVane CL, et al. Two CES1 gene mutations lead to dysfunctional carboxylesterase 1 activity in man: clinical significance and molecular basis. *Am J Hum Genet.* 2008 Jun;82(6):1241–8.
122. Senagore AJ, Champagne BJ, Dosokey E, Brady J, Steele SR, Reynolds HL, et al. Pharmacogenetics-guided analgesics in major abdominal surgery: Further benefits within an enhanced recovery protocol. *Am J Surg.* 2017 Mar;213(3):467–72.
123. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Méneveau N, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2009 Jan 22;360(4):363–75.
124. Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, et al. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics.* 2001 Apr;11(3):217–21.
125. Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther.* 2001 Aug;70(2):189–99.
126. Sakaeda T, Nakamura T, Horinouchi M, Kakumoto M, Ohmoto N, Sakai T, et al. MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Res.* 2001 Oct;18(10):1400–4.
127. Kurata Y, Ieiri I, Kimura M, Morita T, Irie S, Urae A, et al. Role of human MDR1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther.* 2002 Aug;72(2):209–19.
128. Machiela MJ, Chanock SJ. LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. *Bioinforma Oxf Engl.* 2015 Nov 1;31(21):3555–7.
129. Szymezak J, Moreau C, Lorient M-A, Durand E, Van Viet H, Desnos M, et al. High on-clopidogrel platelet reactivity: genotyping can help to optimize antiplatelet treatment. *Thromb Res.* 2011 Jul;128(1):92–5.
130. Sridharan K, Kataria R, Tolani D, Bendkhale S, Gogtay NJ, Thatte UM. Evaluation of CYP2C19, P2Y12, and ABCB1 polymorphisms and phenotypic response to clopidogrel in healthy Indian adults. *Indian J Pharmacol.* 2016 Aug;48(4):350–4.
131. Colley R, Yan B. Genetic determinations of variable responsiveness to clopidogrel and implications for neurointerventional procedures. *Interv Neurol.* 2012 May;1(1):22–30.
132. Zhu W-Y, Zhao T, Xiong X-Y, Li J, Wang L, Zhou Y, et al. Association of CYP2C19 Polymorphisms with the Clinical Efficacy of Clopidogrel Therapy in Patients Undergoing Carotid Artery Stenting in Asia. *Sci Rep.* 2016 03;6:25478.
133. Ge H, Lv X, Ren H, Jin H, Jiang Y, He H, et al. Influence of CYP2C19 genetic polymorphisms on clinical outcomes of intracranial aneurysms treated with stent-assisted coiling. *J Neurointerventional Surg.* 2017 Oct;9(10):958–62.

134. Lin M, Todaro M, Chan J, Churilov L, Zhu WS, Ramdave S, et al. Association between CYP2C19 Polymorphisms and Outcomes in Cerebral Endovascular Therapy. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016 Jan;37(1):108–13.
135. Frelinger AL, Lee RD, Mulford DJ, Wu J, Nudurupati S, Nigam A, et al. A randomized, 2-period, crossover design study to assess the effects of dexlansoprazole, lansoprazole, esomeprazole, and omeprazole on the steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel in healthy volunteers. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Apr 3;59(14):1304–11.
136. Gilard M, Arnaud B, Le Gal G, Abgrall JF, Bosch J. Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated to aspirin. *J Thromb Haemost JTH*. 2006 Nov;4(11):2508–9.
137. Rakicevic L, Nestorovic A. Pharmacogenetics of Clopidogrel Therapy and Neurointerventional Procedures: We Need Precision Data for Precision Medicine. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2018 Jun 19 [cited 2018 Jul 16]; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cpt.1105>
138. Moore JM, Adeeb N, Shallwani H, Gupta R, Patel AS, Griessenauer CJ, et al. A Multicenter Cohort Comparison Study of the Safety, Efficacy, and Cost of Ticagrelor Compared to Clopidogrel in Aneurysm Flow Diverter Procedures. *Neurosurgery*. 2017 Oct 1;81(4):665–71.
139. Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios (AEMPS). Ficha técnica de prasugrel. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Revisada: abril de 2019.
140. Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios (AEMPS). Ficha técnica de ticagrelor. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Revisada: abril de 2019.
141. Oeth P, Mistro G del, Marnellos G, Shi T, Boom D. Qualitative and Quantitative Genotyping Using Single Base Primer Extension Coupled with Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MassARRAY®). In: Komar AA, editor. *Single Nucleotide Polymorphisms* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2009 [cited 2018 Aug 16]. p. 307–43. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-411-1\\_20](http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-411-1_20)
142. Hardy GH. MENDELIAN PROPORTIONS IN A MIXED POPULATION. *Science*. 1908 Jul 10;28(706):49–50.
143. Weinberg, W., 1908 Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. *Jahresh. Ver. Vaterl. Naturkd. Württemb*. 64: 369–382.
144. Iniesta R, Guinó E, Moreno V. [Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies]. *Gac Sanit*. 2005 Aug;19(4):333–41.
145. Saiz-Rodríguez M, Ochoa D, Belmonte C, Román M, Vieira de Lara D, Zubiaur P, et al. Polymorphisms in CYP1A2, CYP2C9 and ABCB1 affect agomelatine pharmacokinetics. *J Psychopharmacol*. 2019. [Accepted manuscript].
146. Haberman SJ. The Analysis of Residuals in Cross-Classified Tables. *Biometrics*. 1973 Mar;29(1):205.

## Bibliografía

147. World Medical Association Declaration of Helsinki (2013): ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 310, 2191-2194.
148. Gil Montalbán E, Zorrilla Torras B, Ortiz Marrón H, Martínez Cortés M, Donoso Navarro E, Nogales Aguado P, et al. [Prevalence of diabetes mellitus and cardiovascular risk factors in the adult population of the autonomous region of Madrid (Spain): the PREDIMERC study]. *Gac Sanit*. 2010 Jun;24(3):233–40.
149. Fitzek S, Leistritz L, Witte OW, Heuschmann PU, Fitzek C. The Essen Stroke Risk Score in one-year follow-up acute ischemic stroke patients. *Cerebrovasc Dis Basel Switz*. 2011;31(4):400–7.
150. Vargas SA, Herrera DA, Cornejo JW. Tratamiento endovascular de 473 aneurismas intracraneanos: resultados angiográficos y clínicos. Experiencia colombiana, 1996-2008. *Biomédica* [Internet]. 2010 Dec [Citado 2019 Apr 23]; 30( 4 ): 567-576. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-41572010000400014&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572010000400014&lng=en).
151. Parrilla G, Zamarro J, Espinosa de Rueda M, Lüttich A, Garrote M, Morales A, et al. [Carotid revascularisation using angioplasty and stent in 134 consecutive cases in a reference hospital: a risky technique?]. *Neurol Barc Spain*. 2010 Oct;25(8):485–90.
152. Verify Now Reference Guide. Accriva Diagnostics.
153. Lee DH, Arat A, Morsi H, Shaltoni H, Harris JR, Mawad ME. Dual Antiplatelet Therapy Monitoring for Neurointerventional Procedures Using a Point-of-Care Platelet Function Test: A Single-Center Experience. *Am J Neuroradiol*. 2008 Aug;29(7):1389–94.
154. Pandya D, Fitzsimmons B, Wolfe T, Hussain S, Lynch J, Ortega-Gutierrez S, et al. Measurement of Antiplatelet Inhibition during Neurointerventional Procedures: The Effect of Antithrombotic Duration and Loading Dose. *J Neuroimaging*. 2010 Jan;20(1):64–9.
155. Gremmel T, Steiner S, Seidinger D, Koppensteiner R, Panzer S, Kopp CW. Adenosine diphosphate-inducible platelet reactivity shows a pronounced age dependency in the initial phase of antiplatelet therapy with clopidogrel. *J Thromb Haemost*. 2010 Jan;8(1):37–42.
156. Sun W, Li Y, Li J, Zhang Z, Zhu W, Liu W, et al. Variant recurrent risk among stroke patients with different CYP2C19 phenotypes and treated with clopidogrel. *Platelets*. 2015;26(6):558–62.
157. Bodily KD, Cloft HJ, Lanzino G, Fiorella DJ, White PM, Kallmes DF. Stent-assisted coiling in acutely ruptured intracranial aneurysms: a qualitative, systematic review of the literature. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2011 Aug;32(7):1232–6.
158. Brott TG, Hobson RW, Howard G, Roubin GS, Clark WM, Brooks W, et al. Stenting versus endarterectomy for treatment of carotid-artery stenosis. *N Engl J Med*. 2010 Jul 1;363(1):11–23.
159. Varenhorst C, Alström U, Scirica BM, Hogue CW, Åsenblad N, Storey RF, et al. Factors Contributing to the Lower Mortality With Ticagrelor Compared With Clopidogrel in

- Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Surgery. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Oct;60(17):1623–30.
160. Granero-Melcon B, Morrás I, Galán-DeJuana M, Abad-Santos F. Appropriateness of the use of proton pump inhibitors in the Emergency Department of a Spanish university hospital. *Rev Espanola Enfermedades Dig Organo Of Soc Espanola Patol Dig*. 2018 Dec;110(12):755–61.
  161. European Medicines Agency (EMA) label information for clopidogrel. Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000174/WC500042189.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000174/WC500042189.pdf) Accessed June 13, 2017.
  162. Yi X, Han Z, Zhou Q, Cheng W, Lin J, Wang C. Concomitant Use of Proton-Pump Inhibitors and Clopidogrel Increases the Risk of Adverse Outcomes in Patients With Ischemic Stroke Carrying Reduced-Function CYP2C19\*2. *Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb*. 2018 Jan;24(1):55–62.
  163. Choi YJ, Kim N, Jang I-J, Cho J-Y, Nam RH, Park JH, et al. Pantoprazole Does Not Reduce the Antiplatelet Effect of Clopidogrel: A Randomized Controlled Trial in Korea. *Gut Liver*. 2017 Jul 15;11(4):504–11.
  164. Furtado RH de M, Giugliano RP, Strunz CMC, Filho CC, Ramires JAF, Filho RK, et al. Drug Interaction Between Clopidogrel and Ranitidine or Omeprazole in Stable Coronary Artery Disease: A Double-Blind, Double Dummy, Randomized Study. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2016 Aug;16(4):275–84.
  165. Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios (AEMPS). Ficha técnica de sertralina. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Revisada: abril de 2019.
  166. Malhotra N, Abunassar J, Wells GA, McPherson R, Fu A, Hibbert B, et al. A pharmacodynamic comparison of a personalized strategy for anti-platelet therapy versus ticagrelor in achieving a therapeutic window. *Int J Cardiol*. 2015 Oct 15;197:318–25.
  167. Gurbel PA, Bliden KP, Samara W, Yoho JA, Hayes K, Fissaha MZ, et al. Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST Study. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Nov 15;46(10):1827–32.
  168. Migliorini A, Valenti R, Marcucci R, Parodi G, Giuliani G, Buonamici P, et al. High residual platelet reactivity after clopidogrel loading and long-term clinical outcome after drug-eluting stenting for unprotected left main coronary disease. *Circulation*. 2009 Dec 1;120(22):2214–21.
  169. Patti G, Nusca A, Mangiacapra F, Gatto L, D'Ambrosio A, Di Sciascio G. Point-of-care measurement of clopidogrel responsiveness predicts clinical outcome in patients undergoing percutaneous coronary intervention results of the ARMYDA-PRO (Antiplatelet therapy for Reduction of MYocardial Damage during Angioplasty-Platelet Reactivity Predicts Outcome) study. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Sep 30;52(14):1128–33.
  170. Lai Y-S, Yang L-T, Kao Yang Y-H, Liu P-Y. Pharmacologic strategy for one repeated stent thrombosis patient with hyporesponsiveness to standard dual antiplatelet therapy. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi*. 2015 Oct;114(10):1022–4.



## Bibliografía

171. Rai M, Seip RL, Gupta A, McKay RG, Hirst J, Thompson PD, et al. CYP2C19 genotype-guided antiplatelet therapy in a patient with clopidogrel resistance. *Conn Med*. 2012 May;76(5):267–72.
172. Chikata Y, Iwata H, Osborn EA, Fukuda K, Okai I, Shiozaki M, et al. Simultaneous subacute coronary artery stent thrombosis in a carrier of two CYP2C19 loss-of function polymorphisms (\*2/\*3). *Int J Cardiol*. 2016 Jun 1;212:148–50.
173. Han Y, Lv H-H, Liu X, Dong Q, Yang X-L, Li S-X, et al. Influence of Genetic Polymorphisms on Clopidogrel Response and Clinical Outcomes in Patients with Acute Ischemic Stroke CYP2C19 Genotype on Clopidogrel Response. *CNS Neurosci Ther*. 2015 Sep;21(9):692–7.
174. Beitelshes AL, Horenstein RB, Vesely MR, Mehra MR, Shuldiner AR. Pharmacogenetics and clopidogrel response in patients undergoing percutaneous coronary interventions. *Clin Pharmacol Ther*. 2011 Mar;89(3):455–9.
175. McDonough CW, McClure LA, Mitchell BD, Gong Y, Horenstein RB, Lewis JP, et al. CYP2C19 metabolizer status and clopidogrel efficacy in the Secondary Prevention of Small Subcortical Strokes (SPS3) study. *J Am Heart Assoc*. 2015 May 27;4(6):e001652.
176. Saab YB, Zeenny R, Ramadan WH. Optimizing clopidogrel dose response: a new clinical algorithm comprising CYP2C19 pharmacogenetics and drug interactions. *Ther Clin Risk Manag*. 2015;11:1421–7.
177. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2007 Nov 15;357(20):2001–15.
178. Información sobre los productos incluidos en la prestación farmacéutica del SNS (dispensables a través de oficinas de farmacia). Nomenclátor de Facturación de MARZO -2019. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. <https://www.mscbs.gob.es/profesionales/nomenclator.do>.
179. Saiz-Rodríguez M, Romero-Palacián D, Villalobos-Vilda C, Caniego JL, Belmonte C, Koller D, et al. Influence of *CYP2C19* Phenotype on the Effect of Clopidogrel in Patients Undergoing a Percutaneous Neurointervention Procedure. *Clin Pharmacol Ther*. 2019 Mar;105(3):661–71.
180. Chen X, Wang L, Zhi L, Zhou G, Wang H, Zhang X, et al. The G-113A polymorphism in CYP1A2 affects the caffeine metabolic ratio in a Chinese population. *Clin Pharmacol Ther*. 2005 Sep;78(3):249–59.
181. Ghotbi R, Christensen M, Roh H-K, Ingelman-Sundberg M, Aklillu E, Bertilsson L. Comparisons of CYP1A2 genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-phenotype relationship in Swedes and Koreans. *Eur J Clin Pharmacol*. 2007 Jun;63(6):537–46.
182. Holmberg MT, Tornio A, Paile-Hyvärinen M, Tarkiainen EK, Neuvonen M, Neuvonen PJ, et al. *CYP3A4*\*22 Impairs the Elimination of Ticagrelor, But Has No Significant Effect on the Bioactivation of Clopidogrel or Prasugrel. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2018 Aug 20 [cited 2018 Oct 31]; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cpt.1177>



183. Verschuren JJW, Boden H, Wessels JAM, van der Hoeven BL, Trompet S, Heijmans BT, et al. Value of platelet pharmacogenetics in common clinical practice of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2013 Sep 10;167(6):2882–8.
184. Ancrenaz V, Desmeules J, James R, Fontana P, Reny J-L, Dayer P, et al. The paraoxonase-1 pathway is not a major bioactivation pathway of clopidogrel in vitro. *Br J Pharmacol.* 2012 Aug;166(8):2362–70.
185. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Man M, Duvvuru S, Walker JR, et al. PON1 Q192R genetic variant and response to clopidogrel and prasugrel: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and a meta-analysis of clinical outcomes. *J Thromb Thrombolysis.* 2016 Apr;41(3):374–83.
186. Sauer G, Kafka A, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, Deissler H. Basal expression of the multidrug resistance gene 1 (MDR-1) is associated with the TT genotype at the polymorphic site C3435T in mammary and ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Lett.* 2002 Nov 8;185(1):79–85.
187. Cuisset T, Frere C, Quilici J, Morange P-E, Saut N, Lambert M, et al. Role of the T744C polymorphism of the P2Y12 gene on platelet response to a 600-mg loading dose of clopidogrel in 597 patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *Thromb Res.* 2007;120(6):893–9.
188. Lyngby JG, Court MH, Lee PM. Validation of a method for quantitation of the clopidogrel active metabolite, clopidogrel, clopidogrel carboxylic acid, and 2-oxo-clopidogrel in feline plasma. *J Vet Cardiol Off J Eur Soc Vet Cardiol.* 2017 Aug;19(4):384–95.

## DIRECCIONES ELECTRÓNICAS

<https://www.pharmgkb.org/vips>

<http://pharmaadme.org/joomla/>

<https://cpicpgx.org/guidelines/>

<https://www.pharmgkb.org/guidelines>

<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2C19>

<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2C9>

<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2C8>

<https://www.pharmvar.org/gene/CYP3A4>

<https://www.pharmvar.org/gene/CYP3A5>

<https://www.pharmvar.org/gene/CYP1A2>

<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2B6>

## Bibliografía

<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>

[https://www.instituto-roche.es/static/pdfs/Propuesta de Recomendaciones MPP.pdf](https://www.instituto-roche.es/static/pdfs/Propuesta_de_Recomendaciones_MPP.pdf)

<https://www.mscbs.gob.es/profesionales/nomenclator.do>

# AGRADECIMIENTOS

Llegados a este punto este me parece el apartado más fácil de escribir de la Tesis Doctoral. Es de bien nacido ser agradecido, por eso resulta fácil echar la vista atrás para recordar todos esos momentos y personas que me han ayudado a crecer personal y profesionalmente durante estos últimos años.

En primer lugar, quiero agradecer a mi Director de Tesis Francisco Abad por haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y ofrecerme la posibilidad de realizar esta Tesis Doctoral. Muchas gracias por todo lo que me has enseñado, tanto en lo profesional como en lo personal, por haberme ayudado siempre a crecer y superarme. Gracias por tu comprensión en los peores momentos y por la fuerza que siempre me has dado para no rendirme, estoy segura de que esas lecciones de vida me acompañarán siempre.

También quiero agradecer a mi Directora de Tesis Carmen Belmonte, por haberme enseñado a dar los primeros pasos y haberme ayudado infinidad de veces. Gracias por acceder a ayudarme una vez más con la realización de esta Tesis. Espero que el esfuerzo haya merecido la pena.

Agradecer también a todo el Servicio de Farmacología Clínica, que ha sido como una familia para mí. Siempre digo que el entorno de trabajo que tenemos es un privilegio.

Quiero agradecer especialmente a mis chicas: a Kenia, por su amistad incondicional, por su alegría infinita, por aportarme siempre el lado positivo, por enseñarme que los polos opuestos también se pueden encontrar y que las lágrimas a veces pueden ser bonitas. A Irene, por ser siempre mi confidente y mi mejor consejera, por escucharme y aportarme una dosis de realidad siempre que la he necesitado. A Gina, por hacerme reír hasta de mí misma, por tener siempre una palabra de apoyo y enseñarme que rendirse no es una opción. A Anita, por enseñarme que las mejores personas son aquellas que se alegran incluso más que tú de las cosas buenas que te pasan, por esa sonrisa que siempre le acompaña. A Lucía, gracias por tener siempre una palabra de

aliento para mí. A Elena, por tus sonrisas y tu apoyo. Ojalá siguiéramos todas las “Ladies” compartiendo desayunos.

A mi “equipo farmacogenética”, millones de gracias. Gracias Dora por ser mi amiga, mi confidente y un gran apoyo para mí. Me alegro mucho de que la vida nos haya juntado. Estoy segura de que allá donde nos lleve el destino seremos siempre capaces de entendernos con una mirada. Gracias Pablo por todos los momentos de risas infinitas que hacen el día a día más llevadero, por el apoyo y los “tú puedes”. Gracias por aportarme a veces esa realidad que me cuesta ver. A los alumnos que he tenido la suerte de que me enseñaran: Carolina, Coral, Danilo y Gonzalo. Gracias porque con vosotros he aprendido y crecido mucho. A nuestra reciente incorporación Marcos, gracias porque tu llegada ha sido un respiro y por mostrarte siempre tan dispuesto.

No puedo olvidarme de las personas que ya no trabajan con nosotros pero que hicieron el día a día más llevadero. A María, gracias por tu esfuerzo y tu paciencia enseñándome, por las risas y los momentos que compartíamos. A Aneta, porque tu sola presencia ya llenaba el laboratorio de alegría, gracias por tantos momentos de comprensión. Os echamos de menos.

Como no podía ser de otra manera, gracias a mis amigos, esas personas que son mi oasis en el desierto: Dani, Juancar, Rubén, Alvarito, Alex, y, especialmente, mis “gallinas”: Andrea, Bea, Juli, Isi. Gracias por todos los momentos en los que me devolvéis un cachito de mi misma que a veces olvido y es que “quien tiene un amigo tiene un tesoro”, ¡y vosotras sois una fortuna!

A mis chicas “Vinarska”: Clau, Hari, Pauli, Didi y Viole, el mayor regalo que pude tener, gracias porque sois parte de mi y siempre estáis conmigo, aunque no nos veamos tanto como nos gustaría. En momentos de debilidad sólo tenemos que echar la vista atrás para volvernos a sentir tan afortunadas como fuimos.

Por último, pero justo por eso más importante, quiero agradecer a mi familia. A mis padres, esos luchadores incansables, por haberme impulsado siempre lo más lejos posible, por tantísimos años de esfuerzo por su parte, que me han llevado a lo que hoy soy. Gracias por haber hecho siempre lo posible y lo imposible por nosotras. Gracias por todos los valores que me habéis inculcado y por ser mi mejor ejemplo. A mi hermana, por ser mi inspiración y mi mayor orgullo, por entenderme siempre y apoyarme incondicionalmente, por abrirme siempre el camino, por tener el mejor consejo y el mejor abrazo para mí, no podría haber tenido una mejor hermana mayor. Me conformo con ser la mitad de valiente, luchadora y fuerte que tú eres. Quiero dar las gracias también a Rubén, por hacerla tan feliz, eso me llena de felicidad también a mi. Finalmente, quiero agradecer especialmente a Nuño, mi compañero de viaje, gracias por todos estos años, por todos esos esfuerzos para que mi vocación no fuera un impedimento, por haber dicho “adelante, yo te apoyo” cuando dije que me iba a estudiar biología. Gracias por recogerme cada vez que me caía. Gracias por tantos momentos y por haberme dado la oportunidad de crecer junto a ti, eres el punto de apoyo para mover mi mundo. A vosotros, gracias por toda la fuerza que me habéis dado y por todas las palabras de ánimo cada domingo, para que no me rindiera y los kilómetros se me hicieran menos. Este también es vuestro logro.

A todos vosotros, muchas gracias.

# ANEXOS

## **ANEXO I. PUBLICACIONES DE LA TESIS DOCTORAL**

### **ARTÍCULO 1: Influence of CYP2C19 Phenotype on the Effect of Clopidogrel in Patients Undergoing a Percutaneous Neurointervention Procedure.**

Saiz-Rodríguez M, Romero-Palacián D, Villalobos-Vilda C, Caniego JL, Belmonte C, Koller D, Bárcena E, Talegón M, Abad-Santos F.

Clin Pharmacol Ther. 2019 Mar;105(3):661-671. doi:10.1002/cpt.1067.

Los resultados de este artículo se presentaron en el congreso “1st PhD Research Symposium in Health Science and Biomedicine” celebrado el 18 de mayo de 2018 en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. La comunicación recibió el premio “Award to best poster communication”.



# Influence of *CYP2C19* Phenotype on the Effect of Clopidogrel in Patients Undergoing a Percutaneous Neurointervention Procedure

Miriam Saiz-Rodríguez<sup>1</sup>, Daniel Romero-Palacián<sup>1</sup>, Carlos Villalobos-Vilda<sup>1</sup>, José Luis Caniego<sup>2</sup>, Carmen Belmonte<sup>1,3</sup>, Dora Koller<sup>1</sup>, Eduardo Bárcena<sup>2</sup>, María Talegón<sup>1</sup> and Francisco Abad-Santos<sup>1,3,4</sup>

This observational retrospective study assessed the antiplatelet response and clinical events after clopidogrel treatment in patients who underwent percutaneous neurointervention, related to *CYP2C19* metabolizer status (normal (NM), intermediate/poor (IM-PM), and ultrarapid (UM); inferred from \*2, \*3, and \*17 allele determination). From 123 patients, IM-PM had a higher aggregation value (201.1 vs. 137.6 NM, 149.4 UM,  $P < 0.05$ ) and lower response rate (37.5% vs. 69.8% NM, 61.1% UM), along with higher treatment change rate (25% vs. 5.7% NM, 10.5% UM). The highest ischemic events incidence occurred in NM (11.3% vs. 6.3% IM, 10.5% UM) and hemorrhagic events in UM (13.2% vs. 0% IM and 3.8% NM). No differences were found regarding ischemic event onset time, while hemorrhagic event frequency in UM was higher with shorter onset time ( $P = 0.047$ ). *CYP2C19* no-function and increased function alleles defined the clopidogrel response. UM patients had increased bleeding risk. Therapeutic recommendations should include dose reduction or treatment change in UM.

## Study Highlights

### WHAT IS THE CURRENT KNOWLEDGE ON THE TOPIC?

☑ *CYP2C19* is the most studied enzyme involved in clopidogrel metabolism. The most common *CYP2C19* no-function or increased function alleles have been associated with a different metabolic response to clopidogrel. NM and UM can take standard doses of clopidogrel. However, it is recommended that IM and PM patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention receive an alternative antiplatelet therapy. However, there is no standard guideline for neurovascular conditions.

### WHAT QUESTION DID THIS STUDY ADDRESS?

☑ The present study intended to elucidate whether IM and PM are at greater risk of thrombosis and UM are at increased risk of bleeding.

### WHAT DOES THIS STUDY ADD TO OUR KNOWLEDGE?

☑ This is the first study associating *CYP2C19* metabolizer status with clinical outcomes in a cohort of patients undergoing neurointerventional procedures. We demonstrated that patients with the UM phenotype are at increased risk of bleeding after percutaneous neurointervention.

### HOW MIGHT THIS CHANGE CLINICAL PHARMACOLOGY OR TRANSLATIONAL SCIENCE?

☑ We suggest that the therapeutic recommendations should also include an adjustment or change of treatment in UM patients, to prevent bleeding complications.

Clopidogrel is a widely prescribed thienopyridine prodrug that inhibits platelet aggregation. It is prescribed in combination with acetylsalicylic acid to prevent atherothrombotic and thromboembolic events in patients who are given a stent implant in carotid, vertebral, or cranial arteries.

About 85% of the parent drug is metabolized to its inactive form (carboxylic acid) by carboxylesterase 1 (CES1) in the liver.<sup>1</sup> The remaining unmodified molecules are metabolized to their

active form by numerous cytochrome P450 (CYP) enzymes in two stages. The first stage includes cytochrome *CYP2C19*, *CYP2B6*, and *CYP1A2*, which convert clopidogrel to 2-oxo-clopidogrel. The second step involves *CYP3A4/5*, *CYP2B6*, *CYP2C9*, and *CYP2C19*, which converts 2-oxo-clopidogrel into its active form.<sup>2</sup> The active metabolite binds rapidly and irreversibly to platelet P2Y<sub>12</sub> receptors, thereby inhibiting platelet activation and aggregation.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Clinical Pharmacology Department, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto Teófilo Hernando, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa (IP), Madrid, Spain; <sup>2</sup>Department of Radiology, Hospital Universitario de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain; <sup>3</sup>UICEC Hospital Universitario de la Princesa, Plataforma SCReN (Spanish Clinical Research Network), Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa (IP), Madrid, Spain; <sup>4</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. Correspondence: Francisco Abad Santos (francisco.abad@salud.madrid.org)

Received 22 December 2017; accepted 27 February 2018; advance online publication 00 Month 2018. doi:10.1002/cpt.1067

CYP2C19 is the most studied enzyme involved in clopidogrel metabolism. More than 2,000 single nucleotide polymorphisms (SNPs) present in the *CYP2C19* gene have been identified, enclosing 28 registered alleles in the Pharmacogene Variation Consortium.<sup>4</sup> However, only SNPs with an allele frequency above 5% (such as \*2, \*3, and \*17) have been studied more extensively.<sup>5</sup> Among the variants that encode reduced or absent activity enzymes, the *CYP2C19*\*2 (rs4244285, 681 G>A) is the most common no-function allele, with a frequency of 12% in Caucasians.<sup>6</sup> The *CYP2C19*\*3 allele (rs4986893, 636 G>A) is less prevalent, representing frequencies below 1% in Caucasians and 7% in Asians.<sup>6</sup> These two variants represent 85% of the *CYP2C19* no-function alleles in the Caucasian population.<sup>6</sup> The *CYP2C19*\*17 allele (rs12248560, -806 C>T) is associated with increased enzymatic activity and it is present in ~21% of the Caucasian population.<sup>6</sup> Based on *CYP2C19* genotype, individuals are categorized into different phenotypes: \*2/\*2, \*2/\*3, or \*3/\*3 as poor metabolizers (PM); \*1/\*2, \*1/\*3, or \*2/\*17 as intermediate metabolizers (IM); \*1/\*1 as normal metabolizers (NM); \*1/\*17 as rapid metabolizers, and \*17/\*17 as ultrarapid metabolizers (UM).<sup>7</sup>

The most common *CYP2C19* no-function polymorphisms have been associated with hyporesponse to clopidogrel, showing lower levels of the active metabolite. Therefore, there is a higher risk of adverse vascular events, including stent thrombosis.<sup>8–11</sup> Moreover, the combination of clopidogrel-aspirin reduces the rate of recurrent stroke in noncarriers but not in carriers of *CYP2C19* no-function alleles.<sup>12</sup> On the contrary, the presence of the increased function allele (\*17) has demonstrated enhanced platelet inhibition and clopidogrel hyperresponse<sup>13–16</sup> and consequently an increased risk of bleeding complications.<sup>10,17,18</sup> There are several therapeutic recommendations according to *CYP2C19* genotype for treatment adjustment that might help to maximize the benefit by reducing the risk of recurrent vascular events, as well as minimize adverse events such as bleeding.<sup>6,19</sup> To summarize, NM and UM can take standard doses of clopidogrel. However, it is recommended that IM and PM patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention receive an alternative antiplatelet therapy<sup>6,20</sup>; however, genotype-guided therapy is not a standard guideline for neurovascular conditions. In this regard, Cavallari *et al.* demonstrated that the risk for cardiovascular events is higher in patients with *CYP2C19* no-function alleles prescribed clopidogrel instead of an alternative therapy.<sup>21</sup>

The aim of the present study was to evaluate the response to clopidogrel therapy and the clinical events that occur during clopidogrel treatment in patients undergoing percutaneous neurointervention. We intended to elucidate whether IM and PM are at greater risk of thrombosis and UM are at increased risk of bleeding.

## RESULTS

### Patient characteristics

In all, 123 patients (59 men and 64 women) derived from the Interventionist Radiology Department were analyzed in this study. **Table 1** summarizes the main demographic and genotypic

characteristics of the study population. All genetic variants were in Hardy–Weinberg equilibrium. The allele frequencies were similar to those found in the literature for the Caucasian population, as the \*2 allele was present in 14% of the study population and the \*17 allele was more commonly found (21.6% of the patients).<sup>22</sup> We could not find any \*3 allele carrier, as its prevalence in Caucasians is below 1%.<sup>22</sup> There were no differences in genotype frequencies according to sex.

The mean age was 64 years and men were older than women (66.6 vs. 61.9,  $P = 0.033$ ). Around 83% of patients had cardiovascular risk factors (**Table 1**). The presence of some cardiovascular risk factors and some previous ischemic or hemorrhagic events was different in men and women; however, there were no significant differences among the three *CYP2C19* phenotype groups in these risk factors and events (**Table 2**).

The most common type of intervention was carotid angioplasty with stent (60.2%), followed by flow diverter (27.6%) and coil application (11.4%). We observed a difference in the treatment duration according to the intervention performed ( $P = 0.003$ ), being smaller when only coils were implanted (median = 60 and range 1–368 days) in contrast to flow diverter (median = 76 and range 1–871 days) and stent (median = 71 and range 1–1,907 days).

Patients treated with stents were mainly men, whereas those treated with flow diverter were women (**Table 1**). Concerning the general outcome, men showed a higher aggregation value and lower treatment duration, while more women required dose reduction and change of antiplatelet drug. Nevertheless, none of these differences reached statistical significance. Likewise, there was no statistically significant difference in the incidence of both ischemic and hemorrhagic events, although both of them were higher in men (16.9% and 8.5%) compared to women (10.9% and 7.8%, respectively).

### Patient outcome

Regarding patient outcome, the mean aggregation value was  $157.9 \pm 92.1$  PRU. According to this parameter, we divided the study population into responders to clopidogrel (58.7%) and nonresponders (41.3%). We found five patients (4.1%) who required a dose reduction due to a hyperresponse to clopidogrel and 15 patients (12.2%) who required a change of treatment due to a hyporesponse objectively measured in the aggregation value.

Moreover, around 20% of the studied population suffered from a subsequent clinical event, stent restenosis being the most prevalent (5.7%) followed by subarachnoid hemorrhage and transient ischemic attack (both 4.9%). Considering the type of events, there was a higher prevalence of ischemic events (9.8%) than hemorrhagic events (5.7%) (**Table 1**). The presence of previous ischemic event was related to the incidence of subsequent ischemic events (odds ratio = 3.9; 95% confidence interval (CI) 0.9–15.9;  $P = 0.06$ ). On the contrary, suffering from a previous hemorrhagic event was not associated with the incidence of subsequent hemorrhagic events.

The clopidogrel treatment duration was shorter in patients with subsequent ischemic events compared to those without any ischemic event (median = 68 and range 12–1,852 days vs.

**Table 1 Main demographic and clinical characteristics of the patients included in this study**

	All (N = 123)	Men (n = 59)	Women (n = 64)	P value
Age (mean ± SD)	64.1 ± 12.2	66.6 ± 12.6	61.9 ± 11.5	<b>0.033</b>
CYP2C19 genotype				0.500
*1/*1	53 (43.1)	28 (47.5)	25 (39.1)	
*1/*2	25 (20.3)	12 (20.3)	13 (20.3)	
*2/*2	1 (0.8)	1 (1.7)	0 (0)	
*2/*17	6 (4.9)	4 (6.8)	2 (3.1)	
*1/*17	31 (25.2)	12 (20.3)	19 (29.7)	
*17/*17	7 (5.7)	2 (3.4)	5 (7.8)	
CYP2C19 phenotype				0.267
NM	53 (43.1)	28 (47.5)	25 (39.1)	
IM-PM	32 (26)	17 (28.8)	15 (23.4)	
UM	38 (30.9)	14 (23.7)	24 (37.5)	
Presence of cardiovascular risk factors	103 (83.7)	52 (88.1)	51 (79.7)	0.267
Hypertension	81 (65.9)	45 (76.3)	36 (56.3)	<b>0.019</b>
Dyslipidemia	62 (50.4)	38 (64.4)	24 (37.5)	<b>0.003</b>
Obesity	1 (0.8)	1 (1.7)	0 (0)	0.480
Atrial fibrillation	2 (1.6)	1 (1.7)	1 (1.6)	1
Diabetes mellitus	23 (18.7)	14 (23.7)	9 (14.1)	0.247
Previous ischemic and hemorrhagic events				
Acute myocardial infarction	7 (5.7)	6 (10.2)	1 (1.6)	0.054
Transient ischemic attack	10 (8.1)	9 (15.3)	1 (1.6)	<b>0.007</b>
Ischemic stroke	19 (15.4)	13 (22.0)	6 (9.4)	0.079
Hemorrhagic stroke	9 (7.33)	1 (1.7)	8 (12.5)	<b>0.034</b>
Type of intervention				<b>&lt;0.001</b>
Flow diverter	34 (27.6)	7 (11.9)	27 (42.2)	
Stent	74 (60.2)	49 (83.1)	25 (39.1)	
Coil	14 (11.4)	2 (3.4)	12 (18.8)	
No intervention	1 (0.8)	1 (1.7)	0 (0)	
Patients with concomitant treatment	119 (96.7)	59 (100)	60 (93.8)	0.120
OACs	5 (4.1)	4 (6.8)	1 (1.6)	0.193
ASA	115 (93.5)	57 (96.6)	58 (90.6)	0.276
Heparin	1 (0.8)	1 (1.7)	0 (0)	0.480
NSAIDs	4 (3.3)	1 (1.7)	3 (4.7)	0.620
PPIs	66 (53.7)	34 (57.6)	32 (50)	0.470
SSRIs	4 (3.3)	0 (0)	4 (6.3)	0.120
Outcome				
Aggregation value, PRU (n = 121)	157.9 ± 92.1	170.5 ± 94.1	146.2 ± 84.3	0.148
Patients responding (n = 121) <sup>a</sup>	71 (58.7)	31 (53.4)	40 (63.5)	0.275
Treatment duration (days)	71 (1-1907)	68 (1-1852)	74 (1-1907)	0.784

**Table 1 Continued on next page**

**Table 1 Continued**

	All (N = 123)	Men (n = 59)	Women (n = 64)	P value
Patients requiring dose reduction	5 (4.1)	1 (1.7)	4 (6.3)	0.367
Patients with change of treatment	15 (12.2)	5 (8.5)	10 (15.6)	0.277
Presence of subsequent clinical event	17 (13.8)	9 (15.3)	8 (12.5)	0.795
Transient ischemic attack	4 (3.3)	2 (3.4)	2 (3.1)	1
Ischemic stroke	1 (0.8)	0 (0)	1 (1.6)	1
Stent restenosis	7 (5.7)	5 (8.5)	2 (3.1)	0.259
Total ischemic events	12 (9.8)	7 (11.9)	5 (7.8)	0.549
Hemorrhagic stroke	2 (1.6)	1 (1.7)	1 (1.6)	1
Subarachnoid hemorrhage	4 (3.3)	1 (1.7)	3 (4.7)	0.620
Other hemorrhagic event	3 (2.4)	1 (1.7)	2 (3.1)	0.497
Total hemorrhagic events	7 (5.7)	3 (5.1)	4 (6.3)	1

Values are presented as mean  $\pm$  SD or n (%) and median (range) for treatment duration, CYP, cytochrome p450 oxidase; NM, IM, UM: extensive, intermediate and ultra-rapid CYP2C19 metabolizers; OACs, oral anticoagulants; ASA, acetylsalicylic acid; NSAIDs, nonsteroidal antiinflammatory drug; PPIs, proton-pump inhibitors; SSRIs, selective serotonin reuptake inhibitors; PRU, P2Y12 Reaction Unit. <sup>a</sup>Patients were considered responders when PRU values were below 180.

median = 71 and range 1–1,907;  $P = 0.05$ ), which continued to be statistically significant in the multivariate analysis (nonstandardized  $\beta$  coefficient = 366.7;  $P = 0.002$ ). On the contrary, there was no statistically significant difference in the treatment duration between patients with (median = 78 and range 4–926 days) or without (median = 71 and range 1–1,907 days) hemorrhagic event;  $P = 0.284$ .

We observed some differences related to *CYP2C19* phenotype, as shown in **Table 3**, with respect to the clinical outcome. *CYP2C19* IM-PM had a higher aggregation value and, thus, a

lower rate of response when compared to *CYP2C19* NM and UM. This difference continued to be statistically significant in the multivariate analysis (IM-PM (nonstandardized  $\beta$  coefficient = 55.7;  $P = 0.002$ ). Additionally, more IM-PM required a change of treatment as a result of a lack of response ( $P = 0.035$ ). As concerns the  $*2/*17$  genotype ( $n = 6$ ), which is classified as IM phenotype by guidelines,<sup>6</sup> we observed that their mean aggregation value ( $175.8 \pm 116.6$  PRU) was between the aggregation value of  $*1/*1$  ( $n = 53$ ) ( $137.5 \pm 91.0$  PRU) and  $*1/*2$  patients ( $n = 25$ ) ( $203.8 \pm 85.6$  PRU).

**Table 2 Presence of cardiovascular risk factors, concomitant treatment and previous ischemic and hemorrhagic events of patients undergoing cerebral vascular intervention according to their *CYP2C19* phenotype**

	<i>CYP2C19</i> IM-PM (n = 32)	<i>CYP2C19</i> NM (n = 53)	<i>CYP2C19</i> UM (n = 38)	P value
Age <sup>a</sup>	65.8 $\pm$ 11.6	64.1 $\pm$ 13.6	62.8 $\pm$ 10.9	0.598
Presence of cardiovascular risk factors	28 (87.5)	46 (86.8)	29 (76.3)	0.348
Hypertension	19 (59.4)	40 (75.5)	22 (57.9)	0.153
Dyslipidemia	19 (59.4)	29 (54.7)	14 (36.8)	0.127
Obesity	1 (3.1)	0	0	0.260
Atrial fibrillation	0	2 (3.8)	0	0.288
Diabetes mellitus	7 (21.9)	8 (15.1)	8 (21.1)	0.506
Currently smoking	13 (40.6)	15 (28.5)	11 (28.9)	0.484
Previous ischemic and hemorrhagic events				
Acute myocardial infarction	2 (6.3)	5 (9.4)	0	0.127
Transient ischemic attack	5 (15.6)	3 (5.7)	2 (5.3)	0.211
Ischemic stroke	6 (18.8)	6 (11.3)	7 (18.4)	0.598
Hemorrhagic stroke	2 (3.8)	3 (9.4)	4 (10.5)	0.377
Under concomitant treatment with PPIs	19 (59.4)	24 (45.3)	23 (60.5)	0.288

Values are presented as n (%) but <sup>a</sup>mean  $\pm$  SD. CYP, cytochrome p450 oxidase; PM, NM, IM, UM: poor, normal, intermediate and ultrarapid CYP2C19 metabolizers; PPIs, proton-pump inhibitors.



**Table 3 Outcome of patients undergoing cerebral vascular intervention according to their CYP2C19 phenotype**

Outcome	CYP2C19 IM-PM (n = 32)	CYP2C19 NM (n = 53)	CYP2C19 UM (n = 38)	P value
Aggregation value, PRU (n = 121) <sup>a</sup>	201.1 ± 90.8*~	137.6 ± 91.0	149.4 ± 84.0	<b>0.006</b>
Patients responding <sup>c</sup>	12 (37.5)	37 (69.8)	22 (61.1)	<b>0.013</b>
Treatment duration (days) <sup>b</sup>	70 (1-1289)	78 (1-1907)	70 (1-1227)	0.211
Patients requiring dose reduction	2 (3.8)	1 (3.1)	2 (5.3)	1
Patients with change of treatment	8 (25.0)	3 (5.7)	4 (10.5)	<b>0.035</b>
Presence of posterior clinical event	2 (6.3)	8 (15.1)	7 (18.4)	0.360
Transient ischemic attack	2 (6.3)	1 (1.9)	1 (2.6)	0.684
Ischemic stroke	0 (0)	0 (0)	1 (2.6)	0.569
Stent restenosis	0 (0)	5 (9.4)	2 (5.3)	0.254
Total ischemic events	2 (6.3)	6 (11.3)	4 (10.5)	0.800
Hemorrhagic stroke	0 (0)	0 (0)	2 (5.3)	0.160
Subarachnoid hemorrhage	0 (0)	2 (3.8)	2 (5.3)	0.574
Other hemorrhagic event	0 (0)	1 (1.9)	2 (5.3)	0.468
Total hemorrhagic events	0 (0)	2 (3.8)	5 (13.2)	<b>0.041</b>

Values are expressed as n (%) but <sup>a</sup>mean ± SD and <sup>b</sup>median (range). <sup>c</sup>Patients were considered responders when PRU values were below 180. Notice that one CYP2C19 NM patient suffered from a subarachnoid hemorrhage and also from epistaxis, considered as "Other hemorrhagic event." Moreover, another CYP2C19 UM patient suffered from a hemorrhagic stroke and also from subarachnoid hemorrhage. CYP, cytochrome p450 oxidase; PM, NM, IM, UM: poor, normal, intermediate and ultra-rapid CYP2C19 metabolizers; PRU, P2Y12 Reaction Unit. \*Bonferroni *post-hoc*  $P = 0.005$  vs. EM and  $P = 0.055$  vs. UM. ~  $P = 0.004$  in multivariate analysis.

Regarding the type of clinical events related to *CYP2C19* phenotype, the prevalence of ischemic events was similar in the NM group (11.3%) compared to IM-PM (6.3%) and UM (10.5%),  $P = 0.358$ . The time until appearance of an ischemic event is shown in **Figure 1a**. Overall, no significant differences were found between the survival functions of the three groups. Thus, there is no evidence of differences with regard to ischemic event onset time between the IM-PM, NM, and UM groups.

On the other hand, the percentage of hemorrhagic events differed significantly among different phenotypes. The highest prevalence of hemorrhagic events was detected in the UM group (13.2%) compared to NM (3.8%) and IM-PM (0%) ( $P = 0.041$ ) (**Table 3**). Attempting to control the influence of other covariates in the risk of bleeding, we performed a multiple logistic regression including sex, age, *CYP2C19* phenotype, presence of cardiovascular risk factors, treatment duration, and concomitant treatment. *CYP2C19* UM was the only covariate that remained significant as a risk predictor (odds ratio = 6.3; 95% CI 1.2–34.0;  $P = 0.033$ ). Haberman-corrected typed residues indicated that the frequency of hemorrhagic events in the UM group (13.2%) was significantly higher than expected under the hypothesis of independence between the variables (5.7%), while the frequencies observed in the IM-PM and NM groups did not differ significantly from the expected frequencies. The onset time of hemorrhagic events is shown in **Figure 1b**. There were differences between groups regarding the hemorrhagic event onset time ( $P = 0.047$ ). However, the comparison by pairs with statistical log-rank did not detect significant differences: IM-PM vs. NM:  $P = 0.303$ ; IM-PM vs. UM:  $P = 0.052$ ; NM vs. UM:  $P = 0.079$ .

### Influence of proton-pump inhibitors

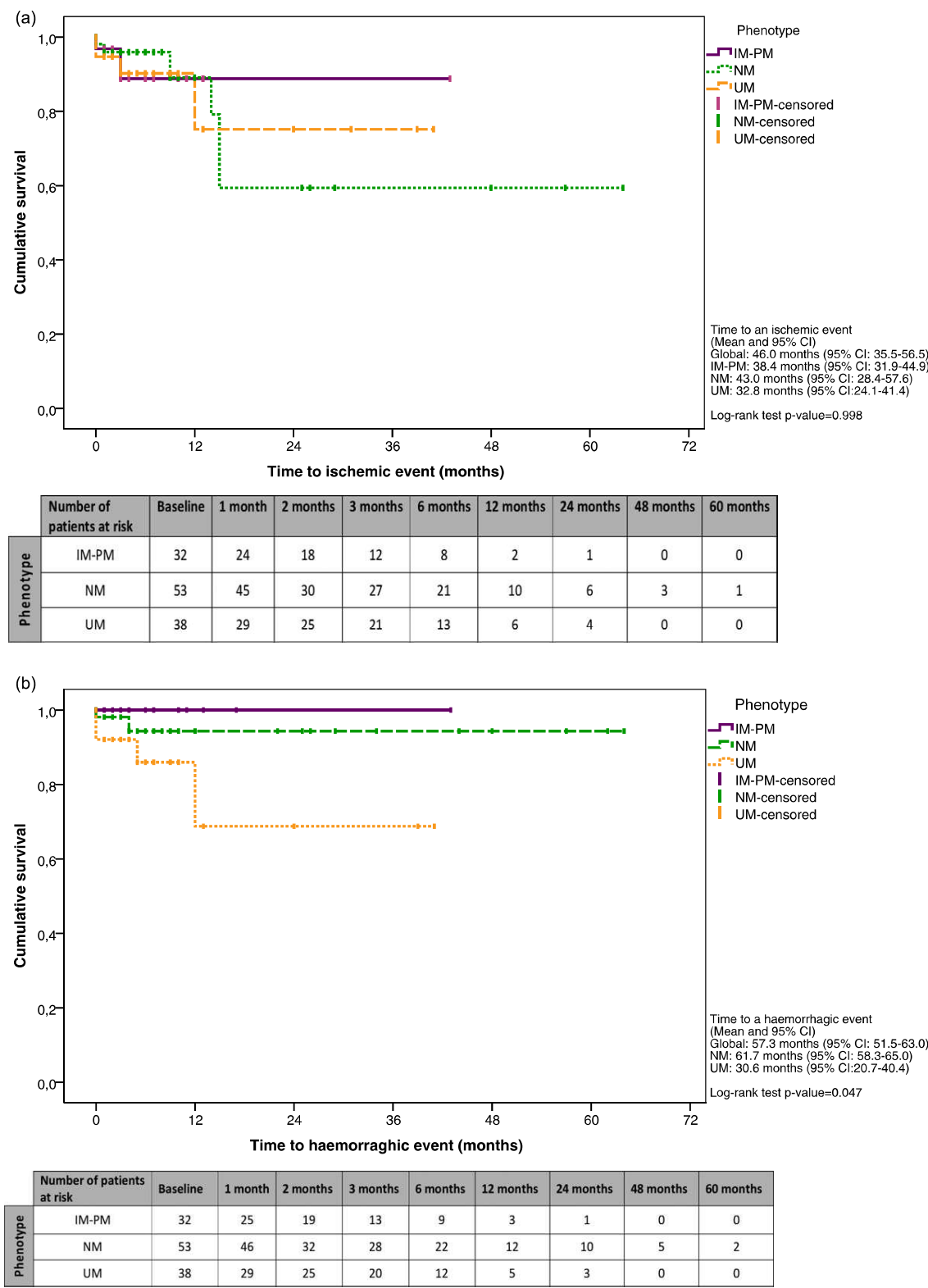
Ninety-six percent of the patients were receiving concomitant treatment, predominantly acetyl salicylic acid (93.5%) and PPIs (53.7%). As shown in **Table 2**, among all phenotype groups the consumption rate of PPIs was higher than 40%, of which the UM group reached the highest percentage (60.5%).

Patients treated with PPIs showed a higher aggregation value compared to those not receiving PPI (178.1 ± 93.6 PRU vs. 134.4 ± 85.1 PRU;  $P = 0.009$ ). This difference was still significant after adjusting for *CYP2C19* phenotype in two-factor ANOVA ( $P = 0.033$ ) and in multivariate linear regression analysis (nonstandardized  $\beta$  coefficient = 40.4;  $P = 0.012$ ) (**Figure 2**).

On the contrary, patients receiving PPIs showed significantly shorter treatment duration (median = 70 and range 1–1,328 days) compared to those without PPI treatment (median = 76 and range 1–1,907 days);  $P = 0.019$ . This difference was still statistically significant in the multivariate analysis (nonstandardized  $\beta$  coefficient = –200.1;  $P = 0.004$ ).

The incidence of subsequent ischemic events (12.3% of patients without PPI vs. 7.6% of patients with PPI;  $P = 0.544$ ) and hemorrhagic events (3.5% of patients without PPI vs. 7.6% of patients with PPIs;  $P = 0.449$ ) was similar in those patients with and without concomitant treatment with PPIs.

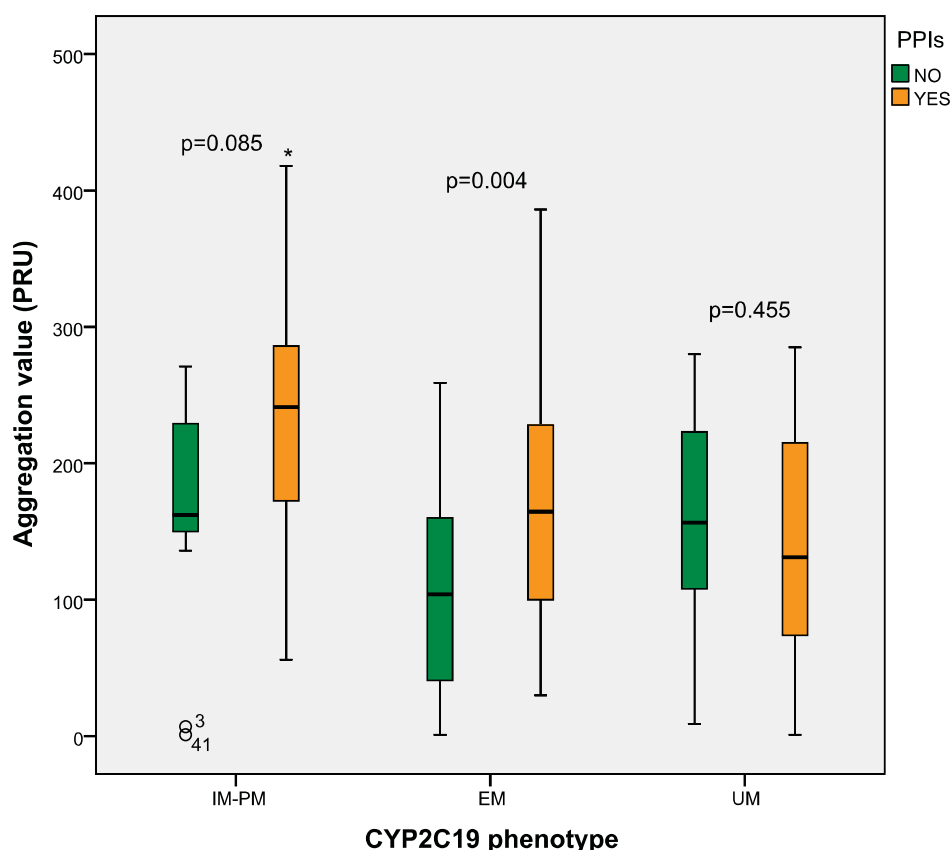
Although it was not significant, when comparing the incidence of subsequent clinical events only in patients receiving PPIs according to their phenotype, we observed that UM suffered more hemorrhagic events (17.4% vs. 4.2% in NM and 0% in IM-PM,  $P = 0.095$ ), while the incidence of ischemic events was similar between the three groups (5.3% in IM-PM, 8.3% in NM,



**Figure 1** The time until the appearance of an (a) ischemic or (b) hemorrhagic event studied by survival analysis with the Kaplan–Meier procedure. [Color figure can be viewed at [cpt-journal.com](http://cpt-journal.com)]

and 8.7% in UM,  $P = 1$ ). Thus, to avoid the influence of CYP2C19 inhibitors, we analyzed the influence of phenotypes in the incidence of subsequent clinical events in patients without

PPI concomitant treatment. There was a higher incidence of ischemic events in NM (13.8%) compared to IM-PM (7.7%) and UM (13.3%), although it was not significant ( $P = 1$ ), along with



**Figure 2** Differences in aggregation values according to the use of concomitant treatment with proton-pump inhibitors and categorized by *CYP2C19* phenotype. \*Bonferroni *post-hoc* test in two-factor ANOVA,  $P = 0.004$  vs. NM and  $P = 0.048$  vs. UM. [Color figure can be viewed at [cpt-journal.com](http://cpt-journal.com)]

a higher incidence of hemorrhagic events in UM (6.7%) compared to NM (3.4%) and IM-PM (0%);  $P = 1$ .

## DISCUSSION

Clopidogrel is a first-line antiplatelet drug commonly prescribed for atherothrombotic and thromboembolic events prevention. Nevertheless, the response to clopidogrel treatment varies widely across a broad range.<sup>23</sup> There are several factors that can alter the response to clopidogrel, such as age, body mass index (BMI), concomitant treatment, current illnesses, and compliance, which account for less than 10% of variability<sup>23</sup>; thus, genetics could play a major role. Furthermore, clinicians are trying to reach the therapeutic window of clopidogrel while keeping the risk of bleeding or thrombosis as low as possible. In this respect, *CYP2C19* genotyping and quantifying the aggregation value can help to determine whether a patient could be at risk.<sup>6</sup> Besides, it has been previously proven that patients receiving personalized antiplatelet therapy based on *CYP2C19* genotype were more likely to achieve a better response.<sup>24</sup>

We observed differences among cardiovascular risk factors, previous ischemic and hemorrhagic events, and type of intervention between sexes; however, we consider these differences not clinically relevant. In addition, in analyzing the influence of these factors in patient outcome, we observed that the type of intervention affects the treatment duration, being higher in both flow diverter and

stent applications, compared to coils. We perceived a lower incidence of recurrent ischemic events (9.8%) and higher incidence of hemorrhagic events (5.7%) when compared to those found in the literature (13.6% and 2.1%, respectively).<sup>25</sup> Furthermore, we found an influence of previous ischemic events and the risk of suffering from a recurrent event of the same type increased by almost 4 times. It is known that patients with initial transient ischemic attack or ischemic stroke have an increased risk of recurrent stroke after 1 year.<sup>26</sup>

Treatment duration was also shorter in those patients who suffered from a subsequent ischemic event, which could be explained because they are more closely evaluated by the clinicians to be reliably identified and improve their clinical outcome.<sup>27</sup>

## Influence of *CYP2C19* phenotype

The fact that *CYP2C19* is remarkably polymorphic, the gene expression and therefore the activity of the enzyme may explain the interindividual variability in response. Pharmacogenetic analysis of *CYP2C19* can identify patients with increased risk of either thrombosis or bleeding due to clopidogrel, and help to choose the most appropriate therapeutic strategy.

High platelet reactivity is commonly described as a risk predictor of ischemic events<sup>28–30</sup> along with the presence of *CYP2C19* no-function alleles.<sup>8–10</sup> There are several case reports that demonstrate the association between *CYP2C19* no-function alleles

and lower clopidogrel response,<sup>31,32</sup> and thus higher risk of thrombosis.<sup>33</sup> On the contrary, despite the evident impact of *CYP2C19* no-function alleles on clopidogrel response, another study was not able to correlate the incidence of ischemic events with *CYP2C19* no-function alleles.<sup>34</sup> According to this, we have shown that the IM-PM phenotype group presents higher aggregation levels and thus a lower response rate, consistent with the expected. However, we failed to find an association between this phenotype and the increased risk of ischemic events, possibly due to the small sample size. Moreover, in our study the IM-PM phenotype was assigned after the results of *CYP2C19* allele \*2 genotyping, known to account for ~12% of clopidogrel response variability.<sup>23</sup> The presence of other polymorphisms in *CYP2B6*,<sup>13</sup> *CYP2C9*,<sup>35</sup> *CYP3A4*,<sup>36</sup> *P2RY12*,<sup>37</sup> *CES1*,<sup>38</sup> *ABCB1*,<sup>39</sup> or *PON1*<sup>40</sup> have been proposed to affect clopidogrel response, but these associations have not been reliably reproduced.<sup>6</sup> Nevertheless, it would be of interest to measure the effect of these genes along with *CYP2C19* no-function alleles in a large cohort of patients to accurately elucidate whether they can affect the response to clopidogrel.

Less is known concerning other *CYP2C19* genotypes.<sup>41</sup> As the majority of case reports correspond to those patients with clopidogrel resistance, the *CYP2C19*\*17 variant is commonly less investigated and consequently there is weaker knowledge of the clinical outcome. Notwithstanding, it is already established that \*17 carriers have lower platelet aggregation and, therefore, they are at higher risk of bleeding.<sup>13–16</sup> However, previous studies failed to demonstrate distinct incidences of major bleeding among different *CYP2C19* metabolizer status.<sup>42</sup> Furthermore, *CYP2C19*\*17 has not been associated with the incidence of clinical events.<sup>25</sup>

In our study, UM patients had significantly higher platelet inhibition and rates of response compared to IM, but not compared to NM. Likewise, we demonstrated that patients with the UM phenotype treated with clopidogrel are at increased risk of bleeding after percutaneous neurointervention. Limited by the small sample size, we were able to find only a few hemorrhagic events; however, those were related to this phenotype. In addition, in the survival analysis we found a significantly shorter onset time of the hemorrhagic event when compared to NM and IM. For this reason, we suggest that therapeutic recommendations should also include dose reduction or treatment change in UM patients, in order to prevent bleeding complications.

Colley and Yan published a review of the implication of *CYP2C19*\*2 for neurointerventional procedures, finding that carriage of this allele is associated with clopidogrel hyporesponsiveness.<sup>43</sup> However, the implications of the *CYP2C19*\*17 allele were still unknown. To our knowledge, this is the first study to associate *CYP2C19* metabolizer status, based on both *CYP2C19* increased and no-function alleles, with clinical outcomes in a cohort of patients undergoing neurointerventional procedures.

In this regard, Saab *et al.* previously proposed a clopidogrel dose adjustment based on distinct *CYP2C19* genotypes and the concomitant use of *CYP2C19* inhibitors or inducers.<sup>44</sup> Further studies in a large cohort of patients should be performed to be

able to calculate proper dose adjustment based on *CYP2C19* metabolizer status.

In case a treatment change is needed, prasugrel and ticagrelor are other therapeutic options, which have the same mechanism of action as clopidogrel but their antiplatelet activity does not depend on *CYP2C19*.

### Influence of proton-pump inhibitors

PPIs are one of the safest classes of drugs extensively prescribed. However, as with every drug, they are not free from causing side effects or adverse events. In particular, a strong interaction between PPIs and clopidogrel has been described.<sup>45</sup> Although the evidence of inhibition varies among the PPIs family, it is considered that all of them inhibit *CYP2C19* activity, omeprazole and esomeprazole being the PPIs with the greatest effect.<sup>46</sup> Thus, the concomitant use of PPIs should be avoided unless unconditionally needed.<sup>45</sup>

Overall, the consumption rate of PPIs in our study population was considerably high (more than 50%). All patients prescribed PPIs were receiving omeprazole, which is known to reduce the metabolite exposure by 40% and the antiplatelet inhibition by around 30%.<sup>47</sup> Consistently, we found a significantly higher aggregation value in patients receiving PPIs, even after adjustment for *CYP2C19* phenotype. Despite this, the variability was not enough to find a difference in the incidence of subsequent ischemic and hemorrhagic events, probably due to the small sample size that limited the events rate. A previous study reported that there was no difference in the frequencies of cardiovascular events between patients treated with or without PPIs.<sup>48</sup> The concomitant use of PPIs was associated with an increased risk of cardiovascular events in carriers of *CYP2C19*\*2 allele.<sup>48</sup>

### Study limitations

The main limitation of our study is the difficulty of measuring the pharmacokinetic parameters of the clopidogrel active metabolite<sup>49</sup>; therefore, we could not objectively quantify the amount of drug metabolized, and thus correlate it with the aggregation value and subsequent events. A previous study demonstrated that *CYP2C19*\*2 allele has an influence on clopidogrel concentrations, and thus on exposure to its metabolite.<sup>50</sup> Another limitation was the small sample size that only enabled us to find one homozygote of the *CYP2C19*\*2 allele; finding more could have increased the incidence of ischemic events and provided data of this association. Moreover, we could not analyze other polymorphisms in genes previously proposed to affect clopidogrel response. Thus, it is important to take into account that these results must be interpreted with caution, given the small sample size. Further studies are needed to increase the statistical power of these results and the validity of them needs to be confirmed in similar settings.

## METHODS

### Study population, design, and procedures

This retrospective observational study analyzed the clinical data of patients undergoing percutaneous neurointervention and treated with clopidogrel, who were genotyped for *CYP2C19*\*2, \*3, or \*17



polymorphisms. We included all analyzed patients from May 2013 to August 2017.

The main studied variables were antiplatelet response and either thrombotic or hemorrhagic events incidence. The collected data from the medical records were demographic factors (age and sex), cardiovascular risk factors (such as hypertension, dyslipidemia, obesity, diabetes mellitus, chronic obstructive pulmonary disease, atrial fibrillation, acute myocardial infarction, or previous ischemic and hemorrhagic events), type of intervention and clinical events (hemorrhages and episodes of thrombosis) that appear in the course of treatment with clopidogrel, which varied from a few days to several months. We also recorded the concomitant treatment with CYP2C19 inhibitors, such as proton-pump inhibitors (PPIs) that could alter the response to clopidogrel.<sup>45</sup> The effect of these interactions on the variables under study was analyzed.

This study complied with the Declaration of Helsinki and current Spanish legislation on clinical research in humans and was approved by the Committee for Ethics of Research with Drugs of Hospital Universitario de La Princesa.

### Antiplatelet response

Antiplatelet response was assessed using the VerifyNow System (Accriva Diagnostics, San Diego, CA), which measures the level of platelet P2Y<sub>12</sub> receptor blockade (PRU - P2Y<sub>12</sub> Reaction Unit) by determining the adenosine diphosphate (ADP)-induced aggregation (extent of platelet aggregation in the presence of P2Y<sub>12</sub> inhibitors). Values below 180 PRU suggest evidence of a P2Y<sub>12</sub> inhibitor effect, while values over 180 PRU suggest that there is no drug effect due to low P2Y<sub>12</sub> inhibition response. Based on these values we classified the patients into responders to clopidogrel (values below 180 PRU) and nonresponders (values over 180 PRU), according to the Verify Now Reference Guide (Accriva Diagnostics). Platelet reactivity tests were performed prior to the intervention was accomplished. Clopidogrel dose was adjusted according to hyper- or hypotreatment response.

### Genotyping

DNA was extracted from 1 mL of peripheral blood samples using the MagNA Pure LC DNA Isolation Kit in an automatic DNA extractor (MagNA Pure System, Roche Applied Science, Indianapolis, IN) and quantified spectrophotometrically in a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), the purity of the samples was measured by the A<sub>260/280</sub> absorbance ratio.

CYP2C19\*2, \*3, and \*17 polymorphisms were studied by real-time polymerase chain reaction (PCR) using LightMix (CYP2C19\*2 and CYP2C19\*3) and LightSNiP (CYP2C19\*17) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) in a LightCycler 2.0 instrument according to manufacturer's instructions (Roche Diagnostics). The reagents used were 1.6 µL MgCl<sub>2</sub>, 1 µL of LightSNiP reagent mix, designed and manufactured by TIB MOLBIOL (Berlin, Germany) specific for each variant; contained premixed primers and probes, 2 µL of FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics, Shannon Co. Clare, Ireland), 8.4 µL H<sub>2</sub>O, and 7 µL DNA (with a concentration range between 40–80 ng/µL). \*2, \*3 and \*17 allele determinations were performed according to the manufacturer's protocol. The genotyping results were analyzed using LightCycler Software 4.1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

### Statistical analysis

In order to simplify the analysis, CYP2C19 genotypes were classified according to the number of functional alleles into IM-PM (\*1/\*2, \*2/\*2, and \*2/\*17), NM (\*1/\*1), and UM (\*1/\*17, and \*17/\*17).

Statistical analysis was performed using the SPSS 22.0 software (Chicago, IL); we considered *P* values lower than 0.05 to be statistically significant. The Hardy–Weinberg equilibrium was estimated for the analyzed variants by a Fisher exact test based on the De Finetti program (available at <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Differences in genotype frequencies according to sex and the comparison of the qualitative variables between different genotypes were determined using a corrected

Pearson chi-square test. Differences in quantitative parameters between individuals were statistically analyzed by a parametric univariate analysis (*t*-test or analysis of variance (ANOVA)) or nonparametric univariate analysis (Kruskal–Wallis). A multiple regression analysis was performed to analyze the effect on aggregation value and incidence of posterior ischemic and hemorrhagic events. The time until the appearance of an ischemic or hemorrhagic event was studied by means of the survival analysis with the Kaplan–Meier procedure, and the differences between the groups were evaluated via the log-rank test. Patients were censored when either clopidogrel treatment or the follow-up was finished.

### CONCLUSION

The pharmacogenetic response to clopidogrel should be defined not only by CYP2C19 no-function but also increased function alleles. As we demonstrated that patients with UM phenotype are at increased risk of bleeding after percutaneous neurointervention, we suggest that the therapeutic recommendations should also include an adjustment or change of treatment in those patients, in order to avoid the bleeding complications. In this respect, both genotyping of CYP2C19 and quantifying the platelet reactivity can help to determine whether a patient could be at risk of either ischemic or hemorrhagic event. Further studies in a large cohort of patients should be performed to calculate proper dose adjustment.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mr. Jesús Garrido for invaluable statistical assistance.

### FUNDING

M. Saiz-Rodríguez is co-financed by Consejería de Educación, Juventud y Deporte from Comunidad de Madrid and Fondo Social Europeo. D. Koller is co-financed by the H2020 Marie Skłodowska-Curie Innovative Training Network 721236 grant.

### CONFLICT OF INTEREST

F. Abad-Santos has been consultant or investigator in clinical trials sponsored by the following pharmaceutical companies: Abbott, Alter, Chemo, Cinfa, FAES, Farmalider, Ferrer, GlaxoSmithKline, Galenicum, Gilead, Janssen-Cilag, Kern, Normon, Novartis, Servier, Silverpharma, Teva, and Zambon. The remaining authors declare no conflicts of interest.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.S.R., D.R.P., and C.V.V. wrote the article; J.L.C., E.B., and F.A.S. designed the research; M.S.R., D.R.P., C.V.V., and M.T. performed research; M.S.R. and F.A.S. analyzed the data; D. K. and C.B. contributed new reagents/analytical tools.

© 2018 American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics

1. Lins, R., Broekhuysen, J., Necciari, J. & Deroubaix, X. Pharmacokinetic profile of 14C-labeled clopidogrel. *Semin. Thromb. Hemost.* **25**(suppl. 2), 29–33 (1999).
2. Sangkuhl, K., Klein, T.E. & Altman, R.B. Clopidogrel pathway. *Pharmacogenet. Genomics* **20**, 463–465 (2010).
3. Savi, P. et al. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb. Haemost.* **84**, 891–896 (2000).
4. The Pharmacogene Variation (PharmVar) Consortium. CYP2C19 allele nomenclature. <<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2C19>>.
5. Lee, S.-J. Clinical application of CYP2C19 pharmacogenetics toward more personalized medicine. *Front. Genet.* **3**, 318 (2012).
6. Scott, S.A. et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. *Clin. Pharmacol. Ther.* **94**, 317–323 (2013).

7. Caudle, K.E. *et al.* Standardizing terms for clinical pharmacogenetic test results: consensus terms from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). *Genet. Med.* **19**, 215–223 (2017).
8. Mega, J.L. *et al.* Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. *JAMA* **304**, 1821–1830 (2010).
9. Giusti, B. *et al.* Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism, but not CYP3A4 IVS10 + 12G/A and P2Y12 T744C polymorphisms, is associated with response variability to dual antiplatelet treatment in high-risk vascular patients. *Pharmacogenet. Genomics* **17**, 1057–1064 (2007).
10. Zabalza, M. *et al.* Meta-analyses of the association between cytochrome CYP2C19 loss- and gain-of-function polymorphisms and cardiovascular outcomes in patients with coronary artery disease treated with clopidogrel. *Heart* **98**, 100–108 (2012).
11. Sibbing, D. *et al.* Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and stent thrombosis following percutaneous coronary intervention. *Eur. Heart J.* **30**, 916–922 (2009).
12. Wang, Y. *et al.* Association between CYP2C19 loss-of-function allele status and efficacy of clopidogrel for risk reduction among patients with minor stroke or transient ischemic attack. *JAMA* **316**, 70–78 (2016).
13. Mega, J.L. *et al.* Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N. Engl. J. Med.* **360**, 354–362 (2009).
14. Frère, C., Cuisset, T., Gaborit, B., Alessi, M.-C. & Hulot, J.-S. The CYP2C19\*17 allele is associated with better platelet response to clopidogrel in patients admitted for non-ST acute coronary syndrome. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 1409–1411 (2009).
15. Sibbing, D. *et al.* Isolated and interactive impact of common CYP2C19 genetic variants on the antiplatelet effect of chronic clopidogrel therapy. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 1685–1693 (2010).
16. Tiroch, K.A. *et al.* Protective effect of the CYP2C19 \*17 polymorphism with increased activation of clopidogrel on cardiovascular events. *Am. Heart J.* **160**, 506–512 (2010).
17. Sibbing, D. *et al.* Cytochrome 2C19\*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation* **121**, 512–518 (2010).
18. Li, Y., Tang, H.-L., Hu, Y.-F. & Xie, H.-G. The gain-of-function variant allele CYP2C19\*17: a double-edged sword between thrombosis and bleeding in clopidogrel-treated patients. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 199–206 (2012).
19. Swen, J.J. *et al.* Pharmacogenetics: from bench to byte—an update of guidelines. *Clin. Pharmacol. Ther.* **89**, 662–673 (2011).
20. Hulot, J.-S., Hajjar, R. & Montalescot, G. Clopidogrel and CYP2C19 testing: ready for clinical prime time? *Clin. Chem.* **58**, 154–157 (2012).
21. Cavallari, L.H. *et al.* Multisite investigation of outcomes with implementation of CYP2C19 genotype-guided antiplatelet therapy after percutaneous coronary intervention. *JACC Cardiovasc. Interv.* **11**, 181–191 (2018).
22. 1000 Genomes Project Consortium, Auton, A. *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature* **526**, 68–74 (2015).
23. Shuldiner, A.R. *et al.* Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA* **302**, 849–857 (2009).
24. Malhotra, N. *et al.* A pharmacodynamic comparison of a personalized strategy for anti-platelet therapy versus ticagrelor in achieving a therapeutic window. *Int. J. Cardiol.* **197**, 318–325 (2015).
25. Sun, W. *et al.* Variant recurrent risk among stroke patients with different CYP2C19 phenotypes and treated with clopidogrel. *Platelets* **26**, 558–562 (2015).
26. Fitzek, S., Leistritz, L., Witte, O.W., Heuschmann, P.U. & Fitzek, C. The Essen Stroke Risk Score in one-year follow-up acute ischemic stroke patients. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* **31**, 400–407 (2011).
27. Maier, I.L., Bauerle, M., Kermer, P., Helms, H.-J. & Buettner, T. Risk prediction of very early recurrence, death and progression after acute ischaemic stroke. *Eur. J. Neurol.* **20**, 599–604 (2013).
28. Gurbel, P.A. *et al.* Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **46**, 1827–1832 (2005).
29. Migliorini A, Valenti R, Marcucci R, Parodi G, Giuliani G, Buonamici P, *et al.* High residual platelet reactivity after clopidogrel loading and long-term clinical outcome after drug-eluting stenting for unprotected left main coronary disease. *Circulation* **120**, 2214–2221 (2009).
30. Patti G, Nusca A, Mangiacapra F, Gatto L, D'Ambrosio A, Di Sciascio G. Point-of-care measurement of clopidogrel responsiveness predicts clinical outcome in patients undergoing percutaneous coronary intervention results of the ARMYDA-PRO (Antiplatelet therapy for Reduction of MYocardial Damage during Angioplasty-Platelet Reactivity Predicts Outcome) study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **52**, 1128–1133 (2008).
31. Lai, Y.-S., Yang, L.-T., Kao Yang, Y.-H. & Liu, P.-Y. Pharmacologic strategy for one repeated stent thrombosis patient with hyporesponsiveness to standard dual antiplatelet therapy. *J. Formos. Med. Assoc. Taiwan Yi Zhi.* **114**, 1022–1024 (2015).
32. Rai, M. *et al.* CYP2C19 genotype-guided antiplatelet therapy in a patient with clopidogrel resistance. *Conn. Med.* **76**, 267–272 (2012).
33. Chikata, Y. *et al.* Simultaneous subacute coronary artery stent thrombosis in a carrier of two CYP2C19 loss-of function polymorphisms (\*2/\*3). *Int. J. Cardiol.* **212**, 148–150 (2016).
34. Han, Y. *et al.* Influence of genetic polymorphisms on clopidogrel response and clinical outcomes in patients with acute ischemic stroke CYP2C19 genotype on clopidogrel response. *CNS Neurosci. Ther.* **21**, 692–697 (2015).
35. Harmsze, A. *et al.* Besides CYP2C19\*2, the variant allele CYP2C9\*3 is associated with higher on-clopidogrel platelet reactivity in patients on dual antiplatelet therapy undergoing elective coronary stent implantation. *Pharmacogenet. Genomics* **20**, 18–25 (2010).
36. Lau, W.C. *et al.* Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance. *Circulation* **109**, 166–171 (2004).
37. Malek, L.A. *et al.* Coexisting polymorphisms of P2Y12 and CYP2C19 genes as a risk factor for persistent platelet activation with clopidogrel. *Circ. J.* **72**, 1165–1169 (2008).
38. Lewis, J.P. *et al.* The functional G143E variant of carboxylesterase 1 is associated with increased clopidogrel active metabolite levels and greater clopidogrel response. *Pharmacogenet. Genomics* **23**, 1–8 (2013).
39. Mega, J.L. *et al.* Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: a pharmacogenetic analysis. *Lancet* **376**, 1312–1319 (2010).
40. Bouman, H.J. *et al.* Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat. Med.* **17**, 110–116 (2011).
41. Beitelshes, A.L. *et al.* Pharmacogenetics and clopidogrel response in patients undergoing percutaneous coronary interventions. *Clin. Pharmacol. Ther.* **89**, 455–459 (2011).
42. McDonough, C.W. *et al.* CYP2C19 metabolizer status and clopidogrel efficacy in the Secondary Prevention of Small Subcortical Strokes (SPS3) study. *J. Am. Heart Assoc.* **4**, e001652 (2015).
43. Colley, R. & Yan, B. Genetic determinations of variable responsiveness to clopidogrel and implications for neurointerventional procedures. *Interv. Neurol.* **1**, 22–30 (2012).
44. Saab, Y.B., Zeenny, R. & Ramadan, W.H. Optimizing clopidogrel dose response: a new clinical algorithm comprising CYP2C19 pharmacogenetics and drug interactions. *Ther. Clin. Risk Manag.* **11**, 1421–1427 (2015).
45. Gilard, M., Arnaud, B., Le Gal, G., Abgrall, J.F. & Bosch, J. Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated to aspirin. *J. Thromb. Haemost.* **4**, 2508–2509 (2006).
46. Frelinger, A.L. *et al.* A randomized, 2-period, crossover design study to assess the effects of dexlansoprazole, lansoprazole, esomeprazole, and omeprazole on the steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel in healthy volunteers. *J. Am. Coll. Cardiol.* **59**, 1304–1311 (2012).
47. European Medicines Agency (EMA) label information for clopidogrel. <[http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_Product\\_Information/human/000174/WC500042189.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_Product_Information/human/000174/WC500042189.pdf)>. Accessed June 13, 2017.

48. Yi, X. *et al.* Concomitant use of proton-pump inhibitors and clopidogrel increases the risk of adverse outcomes in patients with ischemic stroke carrying reduced-function CYP2C19\*2. *Clin. Appl. Thromb.* **24**, 55–62 (2018).
49. Lyngby, J.G., Court, M.H. & Lee, P.M. Validation of a method for quantitation of the clopidogrel active metabolite, clopidogrel, clopidogrel carboxylic acid, and 2-oxo-clopidogrel in feline plasma. *J. Vet. Cardiol.* **19**, 384–395 (2017).
50. Danielak, D. *et al.* Influence of genetic co-factors on the population pharmacokinetic model for clopidogrel and its active thiol metabolite. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **73**, 1623–1632 (2017).

# Clopidogrel response is defined by CYP2C19 metabolizer status in patients undergoing percutaneous neurointervention procedure.

Miriam Saiz-Rodríguez<sup>1</sup>, Daniel Romero-Palacián<sup>1</sup>, Carlos Villalobos-Vilda<sup>1</sup>, José Luis Caniego<sup>2</sup>, Carmen Belmonte<sup>1,3</sup>, Dora Koller<sup>1</sup>, Eduardo Bárcena<sup>2</sup>, María Talegón<sup>1</sup>, Francisco Abad-Santos<sup>1,3,4</sup>.

<sup>1</sup>Clinical Pharmacology Department, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto Teófilo Hernando, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa (IP), Madrid, Spain

<sup>2</sup>Department of Radiology, Hospital Universitario de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain

<sup>3</sup>UIEC Hospital Universitario de la Princesa, Plataforma SCReN (Spanish Clinical Research Network), Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa (IP), Madrid, Spain.

<sup>4</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

\*Corresponding author:

Miriam Saiz-Rodríguez, Clinical Pharmacology Department, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto Teófilo Hernando, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa (IP), Madrid, Spain. E-mail: [miriam.saiz@salud.madrid.org](mailto:miriam.saiz@salud.madrid.org)

**Introduction:** Clopidogrel is a widely prescribed thienopyridine prodrug which inhibits platelet aggregation. It is prescribed to prevent atherothrombotic and thromboembolic events in patients who are given a stent implant in carotid, vertebral or cranial arteries. CYP2C19 is the most studied enzyme involved in clopidogrel metabolism. The most common *CYP2C19* no function polymorphisms (\*2 and \*3) have been associated with hyporesponse to clopidogrel, showing lower levels of the active metabolite. On the contrary, the presence of the increased function allele (\*17) has demonstrated enhanced platelet inhibition and clopidogrel hyperresponse.

**Methods:** This observational retrospective study assessed antiplatelet response and clinical events after clopidogrel treatment in patients who underwent percutaneous neurointervention, related to *CYP2C19* metabolizer status (normal (NM), intermediate/poor (IM-PM) and ultra-rapid (UM)); inferred from \*2, \*3 and \*17 allele determination by real-time PCR).

**Results:** One hundred twenty-three patients were analysed (59 men and 64 women, mean age 64 years), of which 83% had cardiovascular risk factors. The most common type of intervention was angioplasty with stent (60.2%). According to the aggregation value, 58.7% of the patients were responders to clopidogrel; moreover, 4.1% required dose reduction and 12.2% change of treatment. Related to their genotype, 32 (26%) patients were classified as IM-PM; 53 patients (43.1%) as NM and 38 patients (30.9%) as UM. CYP2C19 IM-PM had higher aggregation value (201.1 vs 137.6 NM, 149.4 UM,  $p < 0.05$ ) and lower response rate (37.5% vs. 69.8% NM, 61.1% UM), along with higher treatment change rate (25% vs. 5.7% NM, 10.5% UM). Moreover, 20% of the patients suffered from a subsequent clinical event. The highest ischemic events incidence occurred in NM (11.3% vs. 6.3% IM, 10.5% UM;  $p = 0.358$ ) and haemorrhagic events in UM (13.2% vs. 0% IM and 3.8% NM;  $p = 0.041$ ). No differences found regarding ischemic events' onset time, while haemorrhagic events' frequency in UM was higher with shorter onset time ( $p = 0.047$ ). Additionally, 53% of the patients were receiving concomitant treatment with proton-pump inhibitors (PPIs), which showed significantly higher aggregation value when compared to those not receiving PPI concomitant treatment (178.1 vs. 134.4;  $p = 0.009$ ).

**Conclusion:** CYP2C19 no function and increased function alleles defined clopidogrel response. CYP2C19 genotyping and platelet reactivity quantification help to determine whether a patient could be at risk of ischemic or haemorrhagic event. CYP2C19 UM patients have increased bleeding risk after percutaneous neurointervention. This is the first study to associate CYP2C19 with clinical outcomes in this cohort of patients. Therapeutic recommendations should include an alternative therapeutic option in IM-PM or UM patients.

**Keywords:** CYP2C19; phenotype, antiplatelet; clopidogrel; neurointervention, haemorrhage, ischemia

**Published** May 18, 2018.

Copyright: © 2018 Authors. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Editor:** Name of the editor here.

**Cite as:** Miriam Saiz-Rodríguez, Daniel Romero-Palacián, Carlos Villalobos-Vilda, José Luis Caniego, Carmen Belmonte, Dora Koller, Eduardo Bárcena, María Talegón, Francisco Abad-Santos. Clopidogrel response is defined by *CYP2C19* metabolizer status in patients undergoing percutaneous neurointervention procedure. IBJ Plus 2018 (S2):e00116 doi: 10.24217/2531-0151.18v1s2.00116.

**Funding:** Saiz-Rodríguez M was co-financed by Consejería de Educación, Juventud y Deporte from Comunidad de Madrid and Fondo Social Europeo. D. Koller is co-financed by the H2020 Marie Skłodowska-Curie Innovative Training Network 721236 grant.

**Competing Interests:** F. Abad-Santos has been consultant or investigator in clinical trials sponsored by the following pharmaceutical companies: Abbott, Alter, Chemo, Cinfa, FAES, Farmalíder, Ferrer, GlaxoSmithKline, Galenicum, Gilead, Janssen-Cilag, Kern, Normon, Novartis, Servier, Silverpharma, Teva, and Zambon. The remaining authors declare no conflicts of interest



# 1st PhD Research Symposium in Health Sciences and Biomedicine

School of Medicine UAM, 18 May 2018

We hereby certify that

"Clopidogrel response is defined by CYP2C19 metabolizer status in patients  
undergoing percutaneous neurointervention procedure" by

Miriam Saiz Rodriguez

has obtained an **AWARD TO BEST POSTER COMMUNICATION**

at the 1st PhD Research Symposium in Health Sciences and Biomedicine  
held at School of Medicine UAM on May 18th, 2018



Prof. Concepción Peiró  
On behalf of the Organising Committee



**ARTÍCULO 2: CYP2C19 Ultrarapid Phenotype as a Risk Predictor of Subsequent Events During Clopidogrel Treatment in patients undergoing a percutaneous neurointervention.**

Saiz-Rodríguez M, Belmonte C, Abad-Santos F.

Clin Pharmacol Ther. 2019 May;105(5):1074-1075. doi: 10.1002/cpt.1300. Epub 2019 Jan 16. PubMed PMID: 30652301.

Letter to the Editor.

## LETTER TO THE EDITOR

# CYP2C19 Ultrarapid Phenotype as a Risk Predictor of Subsequent Events During Clopidogrel Treatment in Patients Undergoing a Percutaneous Neurointervention

Miriam Saiz-Rodríguez<sup>1</sup>,  
Carmen Belmonte<sup>1</sup> and  
Francisco Abad-Santos<sup>1</sup>

To the Editor:

Recently, we showed that cytochrome P450 (CYP)2C19 metabolizer status was associated with the clinical outcomes of 123 patients treated with clopidogrel undergoing neurointerventional procedures.<sup>1</sup> Indeed, we demonstrated that carriers of the *CYP2C19*\*2 allele show lower response rate to clopidogrel, and that carriers of the *CYP2C19*\*17 allele are at increased risk of bleeding. Given the lack of knowledge on clopidogrel effect in this cohort of patients,<sup>2</sup> we decided to increase the sample size, adding 21 patients treated in the last year.

Although the results do not change substantially, these new data add more reliable results that are even more consistent with the expected. **Table 1** compares

the patients' outcome according to their CYP2C19 phenotype. It can be observed, resembling the previous study, that CYP2C19 intermediate metabolizer (IM)-poor metabolizer (PM) patients showed a significant lower response to clopidogrel.

As a new result, we found that the incidence of ischemic events was lower in the ultrarapid metabolizer (UM) group, which was significant in the survival analysis. Moreover, the comparison by pairs did not detect significant differences in IM-PM vs. normal metabolizer (NM):  $P = 0.996$  and IM-PM vs. UM:  $P = 0.076$ , whereas there was a difference in NM vs. UM:  $P = 0.017$ . Besides, Haberman-corrected typed residues indicated that the frequencies observed in the UM patients were significantly

**Table 1 Outcome of patients undergoing cerebral vascular intervention according to their CYP2C19 phenotype**

Outcome	CYP2C19 IM-PM (n = 37)	CYP2C19 NM (n = 63)	CYP2C19 UM (n = 44)	P value
Aggregation value, PRU (n = 141) <sup>a</sup>	200.1 ± 84.3 <sup>b,c</sup>	140.3 ± 89.2	157.9 ± 76.8	<b>0.004</b>
Patients responding <sup>d</sup>	13 (35.1)	42 (67.7)	24 (57.1)	<b>0.007</b>
Treatment duration (days) <sup>e</sup>	80 (1–1,623) <sup>f</sup>	80 (1–1,623)	88 (1–1,623)	0.073
Patients requiring dose reduction	2 (5.4)	4 (6.3)	1 (2.3)	0.703
Patients with change of treatment	11 (29.7)	5 (7.9)	4 (9.1)	<b>0.005</b>
Presence of posterior clinical event	5 (13.9)	14 (22.2)	8 (18.2)	0.543
Transient ischemic attack	2 (5.4)	1 (1.6)	0 (0)	0.343
Ischemic stroke	2 (5.4)	3 (4.8)	0 (0)	0.380
Stent restenosis	1 (2.7)	6 (9.5)	1 (2.3)	0.261
Total ischemic events	4 (10.8)	10 (15.9)	1 (2.3) <sup>g</sup>	0.060
Time to an ischemic event	37.8 months (95% CI: 30.9–44.6)	39.7 months (95% CI: 25.1–54.4)	64.1 months (95% CI: 59.1–69.0)	Log-rank test <b>0.043</b>
Hemorrhagic stroke	0 (0)	2 (3.2)	2 (4.5)	0.687
Subarachnoid hemorrhage	0 (0)	0 (0)	1 (2.3)	0.562
Other hemorrhagic event	1 (2.7)	3 (4.8)	5 (11.4)	0.245
Total hemorrhagic events	1 (2.7)	4 (6.3)	7 (15.9) <sup>h</sup>	0.101
Time to a hemorrhagic event	42.3 months (95% CI: 37.2–47.4)	61.5 months (95% CI: 56.6–66.4)	53.0 months (95% CI: 43.3–62.7)	Log-rank test <b>0.041</b>

Bold values represent the significant results. CI, confidence interval; CYP, cytochrome p450 oxidase; IM, intermediate metabolizer; NM, normal metabolizer; PM, poor metabolizer; UM, ultrarapid metabolizers; PRU, P2Y12 Reaction Unit.

Values are expressed as n (%) but <sup>a</sup>mean ± SD or <sup>e</sup>median (range). <sup>d</sup>Patients were considered responders when PRU values were below 180. Notice that one CYP2C19 NM patient had a subarachnoid hemorrhage and also epistaxis, considered as "Other hemorrhagic event." Moreover, another CYP2C19 UM patient had a hemorrhagic stroke and also subarachnoid hemorrhage. Likewise, one CYP2C19 IM-PM patient had a transient ischemic attack and an ischemic stroke. <sup>b</sup>Bonferroni *post hoc*  $P = 0.003$  vs. NM and  $P = 0.085$  vs. UM. <sup>c</sup> $P = 0.001$  in multivariate analysis. <sup>f</sup>Significantly shorter treatment duration (nonstandardized  $\beta$  coefficient =  $-235.6$ ;  $P = 0.027$ ) in multivariate analysis. <sup>g</sup>Significant predictor of the incidence of ischemic events (odds ratio = 0.091; 95% CI 0.010–0.850;  $P = 0.036$ ) in multivariate analysis. <sup>h</sup>Significant predictor of the incidence of hemorrhagic events (odds ratio = 3.6; 95% CI 1.07–12.04;  $P = 0.038$ ) in multivariate analysis.

lower (2.3%) than the expected (9.7%), under the hypothesis of independence between variables. Additionally, in a multiple logistic regression analysis, CYP2C19 UM phenotype remained as a protector factor (odds ratio = 0.091; 95% confidence interval 0.010–0.850;  $P = 0.036$ ), whereas being CYP2C19 NM was not a risk predictor of having an ischemic event.

Conversely, the highest incidence of hemorrhagic events was detected in the UM group, which was significant in the survival analysis. However, the comparison by pairs did not detect significant differences: IM-PM vs. NM:  $P = 0.547$ ; IM-PM vs. UM:  $P = 0.078$ ; and NM vs. UM:  $P = 0.097$ . Nevertheless, Haberman-corrected typed residues indicated that the frequency of hemorrhagic events in the UM group (15.9%) was significantly higher than expected under the hypothesis of independence between the variables (8.3%), whereas

the frequencies observed in the IM-PM and NM groups did not differ significantly from the expected frequencies. Moreover, in the multiple logistic regression analysis, CYP2C19 UM was the only covariate that remained significant as a risk predictor of hemorrhagic events (odds ratio = 3.6; 95% confidence interval 1.07–12.04;  $P = 0.038$ ).

In conclusion, we demonstrated that CYP2C19 UM phenotype was not only a risk factor for the development of hemorrhagic events, but also a protector factor for the incidence of ischemic events.

#### FUNDING

No funding was received for this work.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declared no competing interests for this work.

1. Saiz-Rodríguez, M. et al. Influence of CYP2C19 phenotype on the effect of clopidogrel in patients undergoing a percutaneous neurointervention procedure. *Clin. Pharmacol. Ther.* <<https://doi.org/10.1002/cpt.1067>>. [e-pub ahead of print].
2. Rakicevic, L. & Nestorovic, A. Pharmacogenetics of clopidogrel therapy and neurointerventional procedures: we need precision data for precision medicine. *Clin. Pharmacol. Ther.* <<https://doi.org/10.1002/cpt.1105>>. [e-pub ahead of print].

<sup>1</sup>Clinical Pharmacology Department, Hospital Universitario de La Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain. Correspondence: Francisco Abad-Santos (francisco.abad@salud.madrid.org)

Received 26 October 2018; accepted 29 October 2018; advance online publication 00 Month 2019. doi:10.1002/cpt.1300



**ARTÍCULO 3: Influence of CYP450 enzymes, CES1, PON1, ABCB1 and P2RY12 polymorphisms on clopidogrel response in patients subjected to a percutaneous neurointervention**

Saiz-Rodríguez M, Belmonte C, Caniego JL, Koller D, Zubiaur P, Bárcena E, Romero-Palacián D, Eugene AR, Ochoa D, Abad-Santos F.

Aceptado en la revista Clinical Therapeutics.

Los resultados de este artículo se han presentado como comunicación oral en el II Congreso Interdisciplinar de Genética Humana, celebrado en Madrid del 3 al 5 de abril de 2019.

# Influence of CYP450 enzymes, CES1, PON1, ABCB1 and P2RY12 polymorphisms on clopidogrel response in patients subjected to a percutaneous neurointervention

Miriam Saiz-Rodríguez<sup>1</sup>, Carmen Belmonte<sup>1,2</sup>, José Luis Caniego<sup>3</sup>, Dora Koller<sup>1</sup>, Pablo Zubiaur<sup>1</sup>, Eduardo Bárcena<sup>3</sup>, Daniel Romero-Palacián<sup>1</sup>, Andy R. Eugene<sup>4,5</sup>, Dolores Ochoa<sup>1,2</sup>, Francisco Abad-Santos<sup>1, 2, 6, \*</sup>

<sup>1</sup>Clinical Pharmacology Department, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto Teófilo Hernando, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa (IP), Madrid, Spain.

<sup>2</sup>UICEC Hospital Universitario de la Princesa, Plataforma SCReN (Spanish Clinical Research Network), Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa (IP), Madrid, Spain.

<sup>3</sup>Department of Radiology, Hospital Universitario de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain.

<sup>4</sup>Independent Researcher, Kansas, USA

<sup>5</sup>Independent Neurophysiology Laboratory, Department of Psychiatry, Medical University of Lublin, Lublin, Poland

<sup>6</sup> Pharmacology Department, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

\*Correspondence: Dr. Francisco Abad Santos (francisco.abad@salud.madrid.org)

## ABSTRACT

**Purpose:** Clopidogrel is a thienopyridine prodrug that inhibits platelet aggregation. It is prescribed to prevent atherothrombotic and thromboembolic events in patients receiving a stent implant in carotid, vertebral, or cranial arteries. The influence of CYP2C19 on the response to clopidogrel has been widely studied; however, the effect of other genes involved in clopidogrel absorption and metabolism has not been established in this cohort of patients.

**Methods:** This is an observational retrospective study assessing the antiplatelet response and the incidence of hemorrhagic or ischemic events in percutaneously neurointervened clopidogrel-treated patients, related to 35 polymorphisms in clopidogrel metabolizing enzymes (cytochrome-P450, *CYP2C19*, *CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2C9*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, carboxylesterase-1, CES1, and paraoxonase-1, PON1), the P-glycoprotein transporter (ABCB1) and platelets receptor P2Y<sub>12</sub>. Polymorphisms were analyzed by qPCR and MALDI-TOF mass spectrometry. Antiplatelet response was documented with the VerifyNow System.

**Findings:** We confirmed that CYP2C19 is the most important enzyme involved in clopidogrel response. The carriage of *CYP2C19*\*2 allele was strongly associated with hyporesponse to clopidogrel, while *CYP2C19*\*17 allele was a protective factor for the development of ischemic events (Odds ratio=0.149, p=0.002) but a risk factor for bleeding (Odds ratio=3.60, p=0.038). Patients carrying *ABCB1* mutated alleles showed lower aggregation value, finding clopidogrel absorption clearly influenced by P-glycoprotein. In fact, the percentage of responders was significantly higher in patients carrying the mutated haplotype compared to wild-type (80.8% vs 43.3; p=0.009). Patients with *CES1* G143E C/T genotype showed a considerable lower aggregation value (59.0 ± 21.2 PRU vs. 165.2 ± 86.0 PRU in wild-type patients), although not significant (p=0.084), due to small sample size, which suggests an increased active metabolite formation. No relation was found between polymorphisms in other *CYP* enzymes, *PON1* or *P2RY12* and response to clopidogrel in patients subjected to neurointervention procedures.

Implications: Therapeutic guidelines recommend that CYP2C19 intermediate and poor metabolizers with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention receive an alternative antiplatelet therapy; however, genotype-guided therapy is not a standard recommendation for neurovascular conditions. This is the first study to carry out a joint analysis of *CYP2C19* and other genes involved in clopidogrel treatment in percutaneously neurointervened patients. Our findings support a routine genotyping of clopidogrel-treated patients. Moreover, we encourage considering an alternative antiplatelet therapy in *CYP2C19* intermediate, poor and ultra-rapid metabolizers. Additionally, *ABCB1* polymorphisms could be considered for a better pharmacogenetic approach.

## 1. INTRODUCTION

Clopidogrel is one of the most widely used agents in the perioperative management of patients undergoing neurointerventional procedures. It is a thienopyridine prodrug usually given in combination with acetylsalicylic acid to prevent atherothrombotic and thromboembolic events (1).

Clopidogrel absorption is mainly limited by P-glycoprotein (P-gp) (2), an ATP-dependent transporter encoded by *ABCB1*, located in the intestinal epithelial cell wall which expels the drug into the intestinal lumen. Afterwards, clopidogrel is extensively metabolized in the liver. Most of the parent drug (approximately 85%) is metabolized to its inactive carboxylic acid form by carboxylesterase 1 (CES1) (3). The remaining (15%) undergoes two sequential oxidative stages, through several cytochrome P450 (CYP) enzymes, originating the active metabolite. First, CYP2C19, CYP2B6 and CYP1A2 isoforms convert clopidogrel to 2-oxo-clopidogrel. Second, CYP3A4, CYP3A5, CYP2B6, CYP2C9 and CYP2C19 isoforms and the paraoxonase-1 (PON1) enzyme transform 2-oxo-clopidogrel into its active form (4,5). Besides, 50% of the formed 2-oxo-clopidogrel is also metabolized by CES1 to an inactive compound, consequently, limiting the amount of active metabolite (6). The active metabolite contains a thiol group which binds irreversibly

to platelet P2Y<sub>12</sub> receptors, thereby inhibiting platelet activation and aggregation (7).

Several studies have evaluated the influence of *CYP2C19* polymorphisms on clopidogrel effect. The presence of CYP2C19 intermediate metabolizer (IM) and poor metabolizer (PM) phenotypes have been associated with hyporesponsiveness to clopidogrel, since they show lower levels of active metabolite. Therefore, carriers of these variants have a higher risk of recurrent vascular events (8–11). On the other hand, carriers of CYP2C19 ultra-rapid metabolizer (UM) phenotype have shown greater platelet inhibition and hyperresponsiveness to clopidogrel (12–15), and consequently, an increased risk of hemorrhagic complications (10,16,17). In this respect, the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) made a series of therapeutic recommendations based on *CYP2C19* genotype for clopidogrel-based acute coronary syndromes therapy (18).

It is important to emphasize that the literature on clopidogrel variability is relatively rich mostly in cardiological disorders. However, cerebrovascular disorders addressed with neurointerventional procedures under clopidogrel treatment have not been well investigated. Extrapolation is not an appropriate approach taking into account the biological background, medical condition,

different therapy, risk factors and the fact that anatomical and procedural specificities are different across diseases (19).

Regarding neurovascular conditions, there is no genotype-guided therapeutic recommendation. Our group has previously described an association between the CYP2C19 IM-PM phenotype and hyporesponse to clopidogrel, along with a significantly higher rate of hemorrhagic events in UM patients undergoing a percutaneous neurointervention (20). In the current study, our aim was to

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Study population, design and procedures

This retrospective observational study analyzed the clinical data of patients subjected to percutaneous neurointervention who were treated with clopidogrel. We included 144 patients from May 2013 to October 2018 from Hospital Universitario de La Princesa, Madrid. The primary safety endpoint was the incidence of either thrombotic or hemorrhagic events during the treatment with clopidogrel, which could vary from a few days to several months. Other endpoints included: antiplatelet response, requirement of dose reduction, change of the antiplatelet therapy and treatment duration. All data was collected from the medical records and included demographic factors (age and sex), cardiovascular risk factors (such as smoking status, hypertension, dyslipidemia, obesity, diabetes mellitus, chronic obstructive pulmonary disease, atrial fibrillation, acute myocardial infarction or previous ischemic and hemorrhagic events), and type of intervention. Concomitant treatment with CYP2C19 inhibitors was also taken into account.

This study complied with Declaration of Helsinki and current Spanish legislation on clinical research in humans and was approved

evaluate the effect of *ABCB1*, *CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *PON1*, *CES1* and *P2RY12* genes involved in clopidogrel transport, metabolism and mechanism of action, in this cohort of neurointervened patients, including 21 new cases. This knowledge is of great importance to ensure the correct antiaggregation of these patients and to avoid the risk of subsequent events. Moreover, this research might contribute to the development of genotype-based therapeutic recommendation guidelines for neurovascular conditions.

by the Ethics Committee of Drug Research of Hospital Universitario de La Princesa.

### 2.2 Antiplatelet response

Antiplatelet response was documented with the VerifyNow System (Accriva Diagnostics, San Diego, CA), which determine the level of platelet P2Y<sub>12</sub> receptor blockade (PRU - P2Y<sub>12</sub> Reaction Unit) by measuring the adenosine diphosphate (ADP) induced aggregation (extent of platelet aggregation in the presence of P2Y<sub>12</sub> inhibitors). Platelet reactivity tests were performed prior to the intervention. Values below 180 PRU suggest evidence of a P2Y<sub>12</sub> inhibitor effect while values over 180 PRU suggest no drug effect due to low P2Y<sub>12</sub> inhibition response. Based on these values we classified the patients into responders to clopidogrel (values below 180 PRU) and non-responders (values over 180 PRU), according to the Verify Now Reference Guide (Accriva Diagnostics, San Diego, CA). Clopidogrel dose was adjusted according to hyper- or hypotreatment response.

### 2.3 Genotyping

DNA was extracted from 1 mL of peripheral blood samples using a MagNA Pure LC DNA

Isolation Kit in an automatic DNA extractor (MagNa Pure® System, Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana) and quantified spectrophotometrically in a NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, Delaware), the purity of the samples was measured by the A260/280 absorbance ratio.

We analyzed 35 polymorphisms in 11 genes related to clopidogrel metabolism, transport and mechanism of action. A complete list of the analyzed variants and their functional consequences is described in Supplementary table 1. *CYP2C19*\*2, \*3 and \*17 genotyping was performed by real-time polymerase chain reaction (qPCR) with hybridization probes, designed and manufactured by TIB MOLBIOL (Berlin, Germany) in a LightCycler 2.0 device (Roche Bioscience, Mannheim, Germany), as previously described (19). Of the 144 samples genotyped for *CYP2C19* variants, only 140 were available for genotyping the rest of the polymorphisms. *CYP1A2*\*1C (rs2069514), *CYP2B6*\*9 (rs3745274) and *PON1* rs705379 were genotyped by qPCR using a StepOne® PCR Instrument (Applied Biosystems, CA, USA) and TaqMan assays following the manufacturer recommendations (Applied Biosystems, CA, USA). The genotyping of *ABCB1*, *CYP1A2* (\*1F and \*1B), *CYP2B6*\*5, *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *PON1*, *CES1* and *P2RY12* was performed by MALDI-TOF mass spectrometry, with the MassARRAY® platform (Agena Bioscience Inc., San Diego, CA, USA). All assays were performed with an internal quality control, with a genotyping success rate and reproducibility of 100%.

## 2.4 Statistical analysis

In order to simplify the analysis, genotypes were classified according to CPIC allele definition (21) and allele functionality tables, as the one described by our group for *CYP1A2* (22). Thus, *CYP2C19* genotypes were classified

according to the number of functional alleles into IM-PM (\*1/\*2, \*2/\*2 and \*2/\*17), NM (\*1/\*1), and UM (\*1/\*17 and \*17/\*17). Moreover, *CYP2B6*, *CYP2C8* and *CYP2C9* genotypes were also classified into PM (carriers of two mutated alleles), IM (carriers of *CYP2B6*\*5 or \*9, *CYP2C8* \*2, \*3 or \*4 and *CYP2C9*\*2 or \*3 in heterozygosis), and NM (carriers of \*1/\*1 genotype) according to the functionality of the alleles. *CYP1A2*\*1C, \*1, \*1B and \*1F were assigned an activity score of 0.5, 1, 1.25 and 1.5, respectively. Thus, as previously validated (22), patients with *CYP1A2* \*1/\*1B, \*1/\*1F, \*1B/\*1B, \*1C/\*1F, \*1C/\*1B genotypes were categorized into *CYP1A2* NM/RM phenotype. Moreover, patients with *CYP1A2* \*1B/\*1F and \*1F/\*1F genotypes were assigned an UM phenotype. The only patient with *CYP1A2* \*1C/\*1C genotype was classified as PM. Additionally, patients with *CYP3A4* \*1/\*1 were classified as NM and patients carrying the *CYP3A4* \*1/\*22 and \*22/\*22 genotypes were classified as IM-PM. Likewise, patients with *CYP3A5* \*1/\*3 and \*1/\*6 genotypes were classified as “expressers” and patients carrying *CYP3A5*\*3/\*3 and \*3/\*6 genotype as “non-expressers”. Regarding *PON1*, as there is no functionality table that allows inferring a phenotype, we assigned the NM phenotype to those patients without any mutation. On the contrary, carriers of one mutated allele in any of the three variants analyzed (rs662, rs854560 and rs705379) were considered IM. Carriers of two mutated alleles in any of the three *PON1* variants were considered PM. Finally, *ABCB1* C3435T, C1236T and G2677T/A genotypes were categorized into a haplotype “wild-type” when there was an absence of mutation, “heterozygote” when there was any heterozygous genotype in at least one of the three variants and “mutated” when there was two mutated alleles in any of the three polymorphisms.

For the analysis of the influence of all covariates, the aggregation value was translated into the variable “responders”, which classified aggregation values equal or higher than 180 PRU into non-responders patients and values lower than 180 PRU into responder patients.

Statistical analysis was performed using the SPSS 22.0 software (SPSS Inc., Chicago, Illinois); we considered p values lower than 0.05 to be statistically significant. Differences in genotype frequencies according to sex and the comparison of the qualitative variables between different genotypes were determined using a corrected Pearson chi-square test. Differences in quantitative parameters between individuals were statistically analyzed by a parametric univariate analysis (t test or ANOVA) or non-parametric univariate analysis

(Kruskal-Wallis). A multiple regression analysis was performed to analyze the effect on aggregation value and incidence of posterior ischemic and hemorrhagic events. For this purpose, categorical variables with more than two categories, such as phenotype, were analyzed using dummy variables. The time until the appearance of an ischemic or hemorrhagic event was studied by means of the survival analysis with the Kaplan-Meier procedure. Differences between the groups were evaluated via the Log-rank test with linear trend for factor levels. Patients were censored when either clopidogrel treatment or the follow-up was finished.

As this study has an observational exploratory design, we did not adjust p values for multiple comparisons, according to which some authors recommend (23–25).

### 3. RESULTS

#### 3.1 Patient characteristics

Our study population comprised 144 patients (74 men and 70 women). Table 1 shows their main demographic characteristics. 46.5% of the patients were intervened due to the presence of an aneurysm and 53.5% presented a stenosis. While aneurysms were more frequently found in women, stenosis was more frequently detected in men.

Genotype frequencies are shown in supplementary table 2. There was no difference in the distribution of genotype frequencies among sexes, except for *CYP1A2*\*1C, in which all the carriers were women ( $p=0.025$ ), and *CYP1A2*\*1B in which more women carried the \*1/\*1 genotype (32.4%) than men (13.9%),  $p=0.034$ .

#### 3.2 Patient outcome

The mean aggregation value (measured in 141 of the patients) was  $161.3 \pm 87.3$  P2Y<sub>12</sub> reaction units (PRU). Men showed higher aggregation value ( $173.8 \pm 86.0$  PRU) than women ( $148.1 \pm 87.3$  PRU), although this difference was not significant ( $p=0.081$ ) (table 1). According to this parameter, 56% of the patients were categorized into responders, being this percentage higher in women (64%) than in men (49%),  $p=0.090$ . In all, 5% of the patients required a dose reduction (8.6% of women and 1.4% of men,  $p=0.058$ ), while 14% required a change of treatment. The median treatment duration was 80 days, with a range of 1-3079 days.

Regarding the primary outcome, 18.8% of the patients experienced a clinical event. The incidence of ischemic events was higher (10.4%) than the incidence of hemorrhagic events (8.3%), with no significantly different distribution among sexes. The influence of aggregation values on the incidence of ischemic and haemorrhagic events is shown in table 2. Those patients that suffered an ischemic event showed a higher aggregation value, thus, a lower response to clopidogrel, although it was not statistically significant. There were no differences in the aggregation value between patients that suffered or not a haemorrhagic event. Moreover, from those patients considered clopidogrel responders (PRU<180), 7.6% experienced an ischemic event during

clopidogrel treatment, while this percentage was higher in clopidogrel non-responders (PRU≥180) (14.5%), although it was not significant (p=0.271). Regarding haemorrhagic events, the incidence was similar between responders (7.6%) and non-responders (6.5%), p=1.000).

Table 2. Influence of the aggregation value on the incidence of ischemic and haemorrhagic events.

Ischemic event	Aggregation value	P value
Yes (n=15)	158.3 ± 86.8	0.244
No (n=126)	186.1 ± 90.2	
<b>Haemorrhagic event</b>		
Yes (n=10)	162.0 ± 87.4	0.699
No (n=131)	150.9 ± 89.1	

Table 1. Main demographic and clinical characteristics of the study population.

	All (N=144)	Men (n=74)	Women (n=70)	P value
<b>Age (mean ± SD)</b>	64.8 ± 11.8	67.5 ± 11.5	61.9 ± 11.6	<b>0.004</b>
<b>Presence of cardiovascular risk factors</b>	129 (89.6)	70 (94.6)	59 (84.3)	0.056
Hypertension	91 (63.2)	52 (70.3)	39 (55.7)	0.085
Dyslipidemia	70 (48.6)	44 (59.5)	26 (37.1)	<b>0.008</b>
Obesity	3 (2.1)	1 (1.4)	2 (2.9)	0.612
Atrial fibrillation	3 (2.1)	3 (4.1)	0 (0)	0.245
Diabetes mellitus	28 (19.4)	19 (25.7)	9 (12.9)	0.060
Currently smoking	47 (32.6)	28 (37.8)	19 (27.1)	0.214
<b>Previous ischemic and hemorrhagic events</b>				
Acute myocardial infarction	9 (6.3)	8 (10.8)	1 (1.4)	<b>0.034</b>
Transient ischemic attack	16 (11.1)	15 (20.3)	1 (1.4)	<b>&lt;0.001</b>
Ischemic stroke	20 (13.9)	14 (18.9)	6 (8.6)	0.093
Hemorrhagic stroke	11 (7.6)	1 (1.4)	10 (14.3)	<b>0.004</b>
<b>Reason for intervention</b>				
Aneurysms	67 (46.5)	14 (18.9)	53 (75.7)	<b>&lt;0.001</b>
Stenosis	77 (53.5)	60 (81.1)	17 (24.3)	<b>&lt;0.001</b>
<b>Type of intervention</b>				
Flow diverter	33 (22.9)	7 (9.5)	26 (37.1)	<b>&lt;0.001</b>
Stent	96 (66.7)	63 (85.1)	33 (47.1)	
Coil	12 (8.3)	2 (2.7)	10 (14.3)	
No intervention	3 (2.1)	2 (2.7)	1 (1.4)	
<b>Patients with concomitant treatment</b>	141 (97.9)	73 (98.6)	68 (97.1)	0.612
OACs	4 (2.8)	4 (5.4)	0 (0)	0.120
ASA	139 (96.5)	73 (98.6)	66 (94.3)	0.200
Heparin	1 (0.7)	1 (1.4)	0 (0)	1.000
NSAIDs	7 (4.9)	2 (2.7)	5 (7.1)	0.266
PPIs	110 (76.4)	56 (75.7)	54 (77.1)	0.847
SSRIs	11 (7.6)	2 (2.7)	9 (12.9)	<b>0.028</b>
<b>Patients outcome</b>				
Aggregation value, PRU (n=141)	161.2 ± 87.3	173.8 ± 86.0	148.1 ± 87.3	0.081
Patients responding (n=141)*	79 (56.0)	35 (48.6)	44 (63.8)	0.090
Patients requiring dose reduction	7 (4.9)	1 (1.4)	6 (8.6)	0.058
Patients with change of treatment	20 (13.9)	7 (9.5)	13 (18.6)	0.149
<b>Appearance of subsequent ischemic event</b>	15 (10.4)	8 (10.8)	7 (10.0)	1.000
<b>Appearance of subsequent hemorrhagic event</b>	13 (9.0)	7 (9.5)	6 (8.6)	1.000

Values are presented as mean ± SD or n (%) and median (range) for treatment duration. Abbreviation: OACs, oral anticoagulants; ASA, acetyl salicylic acid; NSAIDs, non-steroid anti-inflammatory drug; PPIs, proton-pump inhibitors; SSRIs, selective serotonin reuptake inhibitors; PRU, P2Y12 Reaction Unit. \* Patients were considered responders when PRU values were below 180.

During the neurointerventional procedures, 4 patients experienced a hemorrhage due to an artery perforation. Two of them were CYP2C19 IM-PM, one was CYP2C19 NM and one was CYP2C19 UM. These hemorrhages were not

considered in the analysis since they were not related to clopidogrel treatment but related to the procedure. Table 3 shows a summary of the patients' outcome according to the different genotypes/phenotypes of the analyzed genes.

Table 3. Outcome of patients undergoing percutaneous neurointervention according to the studied genes.

Gene	Genotype/Phenotype/Haplotype	Aggregation value, PRU (n=141) <sup>a, b</sup>	Patients responding <sup>c</sup>	Ischemic events	Hemorrhagic events
<b>CYP2C19</b>	PM-IM (n=37)	200.1 ± 84.3	13 (35.1)	4 (10.8)	1 (2.7)
	NM (n=63)	140.3 ± 89.2	42 (67.7)	10 (15.9)	5 (7.9)
	UM (n=44)	157.9 ± 76.8	24 (57.1)	1 (2.3)	7 (15.9)
	p-value	0.004	0.007	0.06	0.109
<b>CYP2C9</b>	PM-IM (n=69)	153.7 ± 85.9	39 (56.5)	11 (15.9)	5 (7.2)
	NM (n=71)	173.8 ± 86.3	36 (52.9)	4 (5.6)	8 (11.3)
	p-value	0.173	0.733	0.059	0.563
<b>CYP2C8</b>	PM-IM (n=64)	150.7 ± 85.7	38 (59.4)	10 (15.6)	56 (9.4)
	NM (n=76)	175.1 ± 86.0	37 (50.7)	5 (6.6)	7 (9.2)
	p-value	0.100	0.390	0.104	1.000
<b>CYP1A2</b>	PM (n=1)	60	1 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)
	NM/RM (n=70)	157.2 ± 86.0	41 (60.3)	7 (10.0)	7 (10.0)
	UM (n=69)	171.7 ± 86.5	33 (48.5)	8 (11.6)	6 (8.7)
	p-value	0.303	0.201	0.814	1.000
<b>CYP2B6</b>	PM (n=17)	170.1 ± 65.3	11 (64.7)	3 (17.6)	2 (11.8)
	IM (n=61)	153.1 ± 82.9	33 (56.9)	7 (11.5)	4 (6.6)
	NM (n=62)	171.8 ± 94.4	31 (50.0)	5 (8.1)	7 (11.3)
	p-value	0.474	0.518	0.508	0.646
<b>CYP3A4</b>	PM-IM (n=17)	148.7 ± 99.1	11 (68.8)	3 (17.6)	3 (17.6)
	NM (n=123)	165.7 ± 84.7	64 (52.9)	12 (9.8)	10 (8.1)
	p-value	0.464	0.29	0.395	0.196
<b>CYP3A5</b>	Non-expressers (n=123)	161.4 ± 88.1	68 (56.7)	12 (9.8)	12 (9.8)
	Expressers (n=17)	179.6 ± 73.6	7 (41.2)	3 (17.6)	1 (5.9)
	p-value	0.418	0.3	0.395	1
<b>CES1 rs71647871</b>	C/C (n=138)	165.2 ± 86.0	71 (54.1)	15 (10.9)	13 (9.4)
	C/T (n=2)	59.0 ± 21.2	2 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	p-value	0.084	0.501	1	1
<b>PON1</b>	PM (n=114)	165.3 ± 86.6	59 (52.7)	15 (13.2)	11 (9.6)
	IM (n=19)	164.1 ± 86.3	11 (57.9)	0 (0.0)	1 (5.3)
	NM (n=7)	130.2 ± 90.6	5 (83.3)	0 (0.0)	1 (14.3)
	p-value	0.626	0.358	0.184	0.700



Gene	Genotype/Phenotype/Haplotype	Aggregation value, PRU (n=141) <sup>a, b</sup>	Patients responding <sup>c</sup>	Ischemic events	Hemorrhagic events
ABCB1	Wild-type (n=30)	168.7 ± 87.0	13 (43.3)	4 (13.3)	2 (6.7)
	Heterozygous (n=83)	165.7 ± 88.5	41 (50.6)	10 (12.0)	9 (10.8)
	Mutated (n=27)	151.7 ± 80.9	21 (80.8)	1 (3.7)	2 (7.4)
	p-value	0.727	0.009	0.478	0.922
P2RY12	H1 (n=103)	167.2 ± 86.6	53 (53.0)	10 (9.7)	9 (8.7)
	H2 (n=4)	177.0 ± 78.1	2 (50.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	p-value	0.825	1	1	1

<sup>a</sup>Aggregation value was available for 141 patients who were genotyped for *CYP2C19* and only in 137 patients evaluated for the rest of the genes. Values are expressed as n (%) but <sup>b</sup> mean ± SD. <sup>c</sup> Patients were considered responders when PRU values were below 180.

### 3.3 Influence of *CYP2C19* on patient outcome

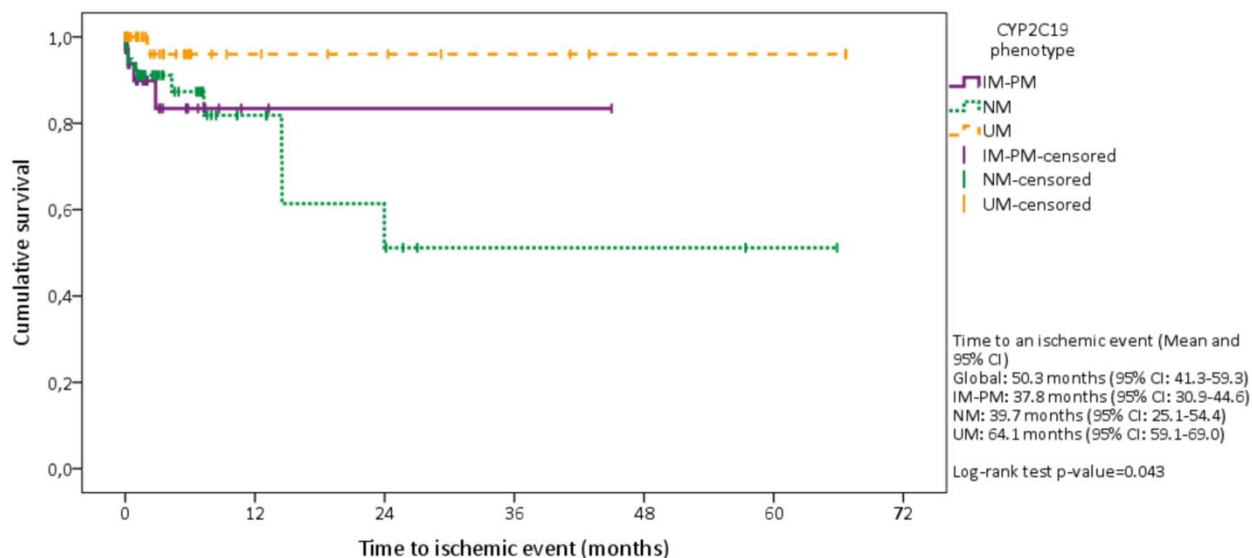
*CYP2C19* clearly had an influence on the patients' outcome. *CYP2C19* IM-PM patients showed a significantly higher aggregation value, which led to a significant worse response to clopidogrel (table 3). This lack of response may explain a significant shorter treatment duration (non-standardized  $\beta$  coefficient = -235.6;  $p = 0.027$ ) in these patients.

Moreover, regarding the primary outcome, the incidence of ischemic events was lower in the UM group (2.3%) compared to IM-PM (10.8%) and NM (15.9%),  $p=0.060$ . Figure 1a shows the time until the appearance of an ischemic event, with a significant difference between the

The highest incidence of hemorrhagic events was detected in the UM group (15.9%) compared to NM (6.3%) and IM-PM (2.7%), although this difference did not reach statistical significance ( $p=0.101$ ). The hemorrhagic events onset time is presented in figure 1b, showing a difference between the survival functions of the three phenotypes ( $p=0.041$ ). However, the comparison by pairs with statistical log-rank did not detect significant differences: IM-PM

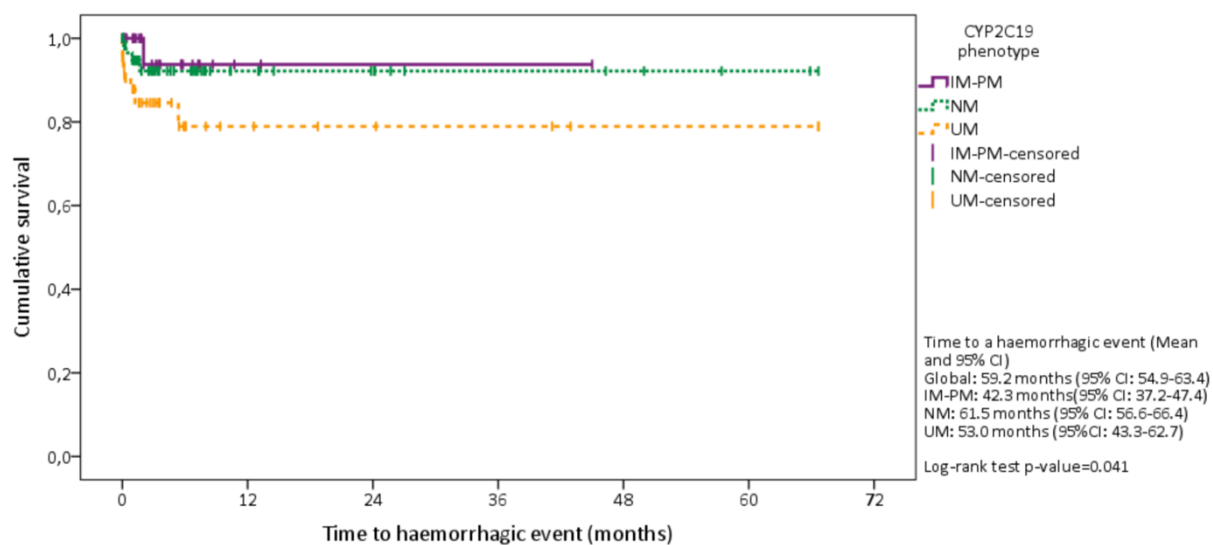
survival functions of the three phenotypes ( $p=0.043$ ). The comparison by pairs with Statistical Log-Rank did not detect significant differences in IM-PM compared to NM ( $p=0.996$ ) and IM-PM compared to UM ( $p=0.076$ ); while there was a significant difference in UM compared to NM ( $p=0.017$ ). Moreover, Haberman-corrected typed residues pointed to a significant lower frequency of ischemic events in the UM group (2.3%) than the expected under the hypothesis of independence between variables (9.7%); while the frequency of ischemic events in NM (15.9%) was not significantly higher compared to the expected.

compared to NM  $p=0.547$ ; IM-PM compared to UM:  $p=0.078$ ; NM compared to UM:  $p=0.097$ . Nevertheless, Haberman-corrected typed residues showed a significantly higher frequency of hemorrhagic events in the UM group (15.9%) than expected (8.3%); while the frequencies observed in the IM-PM and NM groups did not differ significantly from the expected under the hypothesis of independence between variables.



	Number of patients at risk	Baseline	1 month	2 months	3 months	6 months	12 months	24 months	48 months	60 months
Phenotype	IM-PM	37	23	16	13	7	2	1	0	0
	NM	63	49	31	27	21	10	5	2	1
	UM	44	36	25	22	13	9	7	1	1

Figure 1a. The time until the appearance of an (a) ischemic or (b) hemorrhagic event studied by survival analysis with the Kaplan-Meier procedure.



	Number of patients at risk	Baseline	1 month	2 months	3 months	6 months	12 months	24 months	48 months	60 months
Phenotype	IM-PM	37	24	16	13	7	2	1	0	0
	NM	63	52	34	30	24	13	9	4	2
	UM	44	33	23	20	11	7	4	1	1

Figure 1b. The time until the appearance of an (a) ischemic or (b) hemorrhagic event studied by survival analysis with the Kaplan-Meier procedure.

### 3.4 Influence of other CYP enzymes, CES1 and PON1 enzymes on patient outcome

There was no influence of *CYP2C9*, *CYP2C8*, *CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP3A4*, *CYP3A5* and *PON1* on the aggregation value (table 3).

Concerning *CES1*, although it did not reach statistical significance, we observed that patients carrying the G143E (rs71647871) C/T genotype showed a considerable lower aggregation value ( $59.0 \pm 21.2$  PRU) compared to wild-type patients ( $165.2 \pm 86.0$  PRU),  $p=0.084$ .

Regarding the primary outcome, the incidence of ischemic events was higher in the *CYP2C9* PM-IM phenotype (15.9%) compared to NM (5.6%), but it was not statistically significant ( $p=0.059$ ). Nevertheless, no other CYP enzyme, *CES1* or *PON1* had a significant influence on the incidence of ischemic or hemorrhagic subsequent events.

### 3.5 Influence of ABCB1 on patient outcome

There was a tendency towards a lower aggregation value in patients carrying *ABCB1* C3435T, C1236T and G2677T/A mutated alleles. In fact, the percentage of responders was significantly higher in patients carrying the mutated haplotype ( $p=0.009$ ) (table 3). However, there was no association between *ABCB1* haplotypes and the incidence of ischemic or hemorrhagic events.

### 3.6 Influence of P2RY12 on patient outcome

Neither individual polymorphisms nor *P2RY12* haplotypes H1 and H2 (including rs10935838, rs2046934, rs5853517 and rs6809699) had an influence on the aggregation value. Likewise, there was no association between *P2RY12* polymorphisms and the incidence of ischemic or hemorrhagic events.

### 3.7 Influence of the concomitant treatment with proton-pump inhibitors on patient outcome

In all, 76.4% of the patients were receiving proton-pump inhibitors (PPIs) as concomitant treatment, which are *CYP2C19* inhibitors. Of them, 50% were receiving omeprazole and 50% pantoprazole. Patients under PPIs treatment showed a significantly higher aggregation value ( $170.7 \pm 84.5$  PRU) compared to those without PPIs treatment ( $129.0 \pm 90.2$  PRU),  $p=0.017$ . Moreover, both patients receiving omeprazole and pantoprazole showed similar aggregation value ( $170.8 \pm 84.1$  PRU and  $170.6 \pm 85.8$  PRU, respectively). However, the concomitant treatment with PPIs had no influence on the incidence of either ischemic (10.9% of patients receiving PPIs vs. 8.8% of patients not receiving PPIs,  $p=0.768$ ) or hemorrhagic events (9.1% of patients receiving PPIs vs. 5.9% of patients not receiving PPIs,  $p=0.732$ ).

### 3.8 Results from the multivariate analysis

A multiple regression analysis was performed considering the aggregation value, the response rate and the incidence of ischemic and hemorrhagic events as dependent variables. It included sex, age, polymorphisms in all the genes analyzed, presence of cardiovascular risk factors (hypertension, dyslipidemia, obesity, atrial fibrillation, diabetes mellitus and current smoker), previous ischemic or hemorrhagic events, type of intervention and concomitant treatment with PPIs as independent variables. A summary of the results is shown in table 4.

Briefly, age, PPI concomitant treatment and *CYP2C19* IM-PM phenotype appeared to be predictors of a worse response due to a higher aggregation value. Besides, being intervened with a flow diverter was a predictor of a better response, compared to stent and coils interventions. These four factors explained

26.4% of the model variance ( $r^2=0.327$ ). When transforming the aggregation value into a categorical variable, we observed that age and CYP2C19 IM-PM remained as worse response predictors. Additionally, *ABCB1* mutated haplotype appeared as a predictor of a better response ( $r^2=0.433$ ).

In addition, as shown in table 4, CYP2C19 UM phenotype was a protective factor while the treatment duration was a risk factor for the development of ischemia. Regarding the prediction of hemorrhagic events, CYP2C19 UM appeared to be the only risk factor.

Table 3. Results from the multivariate analysis

Variables Contributing to P2Y12 Receptor Blockade (Aggregation value as dependent variable)						
Aggregation Value Predictors	Non-standardized $\beta$ coefficient	p-value	Semi-partial correlation	Contribution to model variance	Additive contribution to model variance	P2Y12 Receptor Blockade
Age	2.235	0.001	0.288	8.2%	8.2%	Worse response
CYP2C19 IM-PM	59.519	<0.001	0.302	9.1%	17.3%	Worse response
Flow diverter	-52.848	0.004	-0.243	5.9%	23.2%	Better response
PPIs treatment	38.404	0.029	0.181	3.2%	26.4%	Worse response
Adjusted R-squared= 0.327						

Variables Contributing to P2Y12 Receptor Blockade (PRU>179 = Non-Responders)					
Response rate predictors	Odds-Ratio	Lower 95% CI	Upper 95% CI	p-value	P2Y12 Receptor Blockade
Age	0.895	0.849	0.943	<0.001	Worse response
CYP2C19 IM-PM	0.149	0.045	0.498	0.002	Worse response
ABCB1 mutated	6.298	1.555	25.499	0.010	Better response
R-squared= 0.433					

Variables predicting the incidence of ischemic events					
Ischemia Predictors	Odds-Ratio	Lower 95%CI	Upper 95%CI	p-value	Variable
CYP2C19 UM	0.060	0.003	1.076	0.056	Protective factor
Treatment duration (months)	1.041	1.007	1.077	0.017	Risk predictor
R-squared= 0.255					

Variables predicting the incidence of hemorrhagic events					
Hemorrhage Predictors	Odds-Ratio	Lower 95%CI	Upper 95%CI	p-value	Variable
CYP2C19 UM	3.60	1.071	12.1	0,038	Risk predictor
R-squared= 0.070					

## 4. DISCUSSION

The variability related to clopidogrel response is a well-known aspect, since a range of 4-30% of patients are non-responders (26). Therefore, these patients are at increased risk of experiencing ischemic events after stent implantation (27). Factors such as age, body mass index, comorbidities, concomitant treatment, and compliance explain less than 10% of this variability (28). Consequently, the role of genetics could be of great importance.

### 4.1 Influence of CYP2C19

According to the expected, we found that CYP2C19 UM phenotype is a protective factor for the development of ischemic events, which was already observed in our previous work (28). Our results contradict those of Lin *et al.*, who found that the carriage of CYP2C19\*17 allele was associated with the incidence of ischemic events (30). In fact, we previously showed an increased risk of bleeding in CYP2C19 UM patients (29,31), which Haberman-corrected typed residues confirmed in the current study with a larger sample size. We encourage considering this fact for the treatment approach of these patients.

Furthermore, Zhu *et al.* established a correlation between CYP2C19 no function alleles and an increased risk of subsequent ischemic events in patients subjected to stent implantation in the carotid artery (32). However, in our study, we could not confirm this fact, probably due to the small sample size. Moreover, carriers of CYP2C19\*2 allele are more closely evaluated in clinical practice. In fact, after the vast amount of evidence, most clinicians decide to change clopidogrel for an alternative therapy to avoid the risk of subsequent events. Conversely, what we could confirm is the premise by Colley and Yan, who published a revision about the association between the carriage of CYP2C19\*2 allele and hyporesponse to clopidogrel in neurointervened patients (1). This circumstance was already observed in our previous work with a lower sample size (31).

Besides, Moore *et al.* analyzed the efficacy, safety and cost of clopidogrel treatment compared to ticagrelor in patients with cerebral aneurysms treated with flow diverter. They found that ticagrelor was not inferior when preventing thromboembolic complications. However, due to the much higher cost of ticagrelor, this alternative therapy should be used only in clopidogrel non-responders (33). Based on our results, we suggest that both CYP2C19 IM-PM and UM should receive an alternative antiplatelet therapy.

### 4.2 Influence of other CYP enzymes, CES1 and PON1

There is controversy whether there is an association of CYP2C9 most studied alleles (\*2 and \*3) and clopidogrel effect. Some authors state no significant relationship (12), while others associate the presence of \*3 allele with a higher incidence of stent thrombosis (34). In our study, CYP2C8 or CYP2C9 were not associated with a difference in clopidogrel response. However, we observed a tendency towards a higher incidence of ischemic events in subjects carrying CYP2C8 or CYP2C9 PM-IM phenotype, which was not statistically significant neither in univariate nor in multivariate analyses. Further approaches with larger sample sizes would be of interest.

Reduced CYP3A4 activity was associated with an increased risk of stent thrombosis in patients with acute coronary syndrome treated with clopidogrel (35). Indeed, one study postulates that the role of CYP3A4/5 in the metabolism of clopidogrel may be of greater relevance than has been previously described (36). However, in our study, CYP3A4 and CYP3A5 showed no significant role in explaining some of the response variability, since a large portion of CYP3A variability is not accounted by the genetic polymorphisms chosen in our study. Nevertheless, our results resembled those of Holmberg *et al.* who found that neither CYP3A4 nor CYP3A5 genotypes affected clopidogrel area under the concentration-time curve or platelet inhibition

in healthy volunteers (37). Furthermore, the *CES1* G143E polymorphism (rs71647871) was associated with a decreased protein functionality (38). Lewis *et al.* found that carriers of the mutated allele showed higher levels of the active metabolite and, therefore, a better response to clopidogrel in patients with coronary disease (39). Consistent with these studies, we have found a tendency towards a lower aggregation value in patients carrying the mutation, which can be explained by an increased active metabolite formation due to a lower *CES1* functionality. However, our limited sample size was not sufficient to find statistically significant results, since we could only find two carriers of G143E defective allele. Further research is needed in this cohort of patients to confirm if there is an association.

Regarding *PON1*, the Q192R polymorphism (rs662) was described to condition the active metabolite formation (5). In our study, we observed that patients carrying defective *PON1* alleles (assigned as PM and IM) showed a tendency towards a higher aggregation value, although it was not significant. This fact is consistent with the study previously reported by Verschuren *et al.*, who found that patients carrying the rs662 defective allele may have lower levels of active metabolite, thus, resulting in a poorer response and an increased risk of ischemic events (40). In our study, the incidence of ischemic events was higher in the PM group, but it was not significant and deserves further research. However, there is controversy whether clopidogrel is a *PON1* substrate, since other authors state that there is no relation of Q192R with differences in pharmacologic and clinical clopidogrel response (41,42).

#### 4.3 Influence of *ABCB1*

Taubert *et al.* described lower levels of clopidogrel and its metabolite in patients carrying the *ABCB1* C3435T T/T genotype, probably due to an increased expression of P-gp (2). Conversely, our results suggest that patients carrying the C3435T, C1236T or G2677T/A minor alleles have a reduced P-gp

expression, since we found a better response prediction in patients carrying the *ABCB1* mutated haplotype. This could be explained by higher concentrations of clopidogrel and its metabolite, since the efflux pump would be working inefficiently. Some studies relate the most studied *ABCB1* polymorphism, C3435T, to a lower P-gp expression in minor allele carriers (43–46). Moreover, some in vitro studies associate the T minor allele with altered protein folding and reduced activity (47). Indeed, if the minor alleles are associated with reduced transporter functionality, it is expected that these patients show higher concentrations of P-gp substrate drugs, as a result of a minor elimination. For this reason, clopidogrel absorption might be influenced by *ABCB1* polymorphisms.

#### 4.4 Influence of *P2RY12*

Finally, as *P2RY12* is the gene encoding for clopidogrel target receptor P2Y<sub>12</sub>, some polymorphisms (rs10935838, rs2046934, rs5853517 and rs6809699) were associated with enhanced platelet reactivity (48,49). However, these associations were not replicated and the level of evidence is low. In our study, we could not find a significant association in *P2RY12* haplotypes related to clopidogrel response. The lack of association between *P2RY12* polymorphisms and clopidogrel response matches the results from Giusti *et al.* (9) and Cuisset *et al.* (50). They demonstrated that *P2RY12* rs2046934 was not associated with antiplatelet activity in clopidogrel-treated patients with acute coronary syndrome. Moreover, Simon *et al.* described no association between rs16846673, rs6809699 and rs6785930 and risk of adverse cardiovascular events in patients with acute myocardial infarction receiving clopidogrel (51).

#### STUDY LIMITATIONS

Our main limitation is our unfeasibility of measuring clopidogrel and its active metabolite concentrations, which could have been useful to correlate it with patients' aggregation value

and clinical outcome. Moreover, the small sample size limited us from finding more patients carrying some minor alleles with a low frequency that might be related to clopidogrel metabolism, like *CES1* polymorphisms. Hence, further investigation is warranted. Other possible limitation is the lack of multiple comparison correction, which could have led to false positive results. However, some experts recommend not to correct for multiple testing when analysing data (23–25). Indeed, it is recommended to account for multiple comparison once interpreting the results, rather than in calculations. In fact, some authors state that the use of multiple comparison correction should be avoided to perform empirical research, since there is a potential cost of many more false negatives when controlling for false positives (52,53).

## 5. CONCLUSION

We confirmed that *CYP2C19* is the most important enzyme involved in clopidogrel

response. Indeed, the carriage of *CYP2C19*\*2 allele is strongly associated with a hyporesponse to clopidogrel in neurointervened patients. Carrying the *CYP2C19*\*17 allele is a protective factor for the development of ischemic events, while it is a risk factor for bleeding complications. An alternative therapy should be prescribed for *CYP2C19*\*2 carriers but also for patients carrying *CYP2C19*\*17 allele, to avoid bleeding complications. Moreover, we found a lower aggregation value in *ABCB1* mutated patients, being this haplotype a predictor of a better response, finding clopidogrel absorption clearly influenced by P-glycoprotein. Patients carrying the *CES1* G143E C/T genotype showed a considerable lower aggregation value, although not significant, which suggests an increased active metabolite formation. To date, the influence of polymorphisms in other CYP enzymes, *CES1*, *PON1* or *P2RY12* in clopidogrel treatment is not demonstrated in patients subjected to neurointervention procedures.

## STUDY HIGHLIGHTS

### What is the current knowledge on the topic?

There is no standard guideline for clopidogrel treatment in patients with neurovascular conditions. In our previous work we confirmed the influence of *CYP2C19* alleles on clopidogrel response.

### What question did this study address?

This is the first study to carry out a joint analysis of *CYP2C19* and other genes involved in clopidogrel treatment in patients subjected to percutaneous neurointervention.

### What does this study add to our knowledge?

This study confirms that *CYP2C19* is the most important enzyme involved in clopidogrel response. Indeed, *CYP2C19* UM phenotype is a

protective factor for the development of ischemic events, while it is a risk factor for bleeding complications. In addition, *ABCB1* is a relevant factor affecting clopidogrel distribution. Finally, the presence of *CES1* G143E polymorphism might increase clopidogrel response, which needs to be confirmed.

### How this might change clinical pharmacology or translational science?

We advise a routine genotyping of clopidogrel-treated patients. Moreover, we encourage considering an alternative antiplatelet therapy in *CYP2C19* IM-PM and UM patients. Additionally, *ABCB1* polymorphisms could be considered for a better pharmacogenetic approach.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.S.R., C.B., D.K., P.Z. wrote the manuscript; J.L.C., E.B., D.O. and F.A.S designed the research; M.S.R., C.B., D.K., P.Z. and F.A.S. performed

research, M.S.R. and D.R.P. analyzed the data; A.E. contributed with analytical tools.

## REFERENCES

1. Colley R, Yan B. Genetic determinations of variable responsiveness to clopidogrel and implications for neurointerventional procedures. *Interv Neurol*. 2012 May;1(1):22–30.
2. Taubert D, von Beckerath N, Grimberg G, Lazar A, Jung N, Goesser T, *et al*. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther*. 2006 Nov;80(5):486–501.
3. Lins R, Broekhuysen J, Necciari J, Deroubaix X. Pharmacokinetic profile of <sup>14</sup>C-labeled clopidogrel. *Semin Thromb Hemost*. 1999;25 Suppl 2:29–33.
4. Sangkuhl K, Klein TE, Altman RB. Clopidogrel pathway. *Pharmacogenet Genomics*. 2010 Jul;20(7):463–5.
5. Bouman HJ, Schömig E, van Werkum JW, Velder J, Hackeng CM, Hirschhäuser C, *et al*. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med*. 2011 Jan;17(1):110–6.
6. Trenk D, Hochholzer W. Genetics of platelet inhibitor treatment. *Br J Clin Pharmacol*. 2014 Apr;77(4):642–53.
7. Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, Combalbert J, Picard C, Maffrand JP, *et al*. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost*. 2000 Nov;84(5):891–6.
8. Mega JL, Simon T, Collet J-P, Anderson JL, Antman EM, Bliden K, *et al*. Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. *JAMA*. 2010 Oct 27;304(16):1821–30.
9. Giusti B, Gori AM, Marcucci R, Saracini C, Sestini I, Panicia R, *et al*. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism, but not CYP3A4 IVS10 + 12G/A and P2Y12 T744C polymorphisms, is associated with response variability to dual antiplatelet treatment in high-risk vascular patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2007 Dec;17(12):1057–64.
10. Zabalza M, Subirana I, Sala J, Lluís-Ganella C, Lucas G, Tomás M, *et al*. Meta-analyses of the association between cytochrome CYP2C19 loss- and gain-of-function polymorphisms and cardiovascular outcomes in patients with coronary artery disease treated with clopidogrel. *Heart*. 2012 Jan 15;98(2):100–8.
11. Sibbing D, Stegherr J, Latz W, Koch W, Mehilli J, Dörrler K, *et al*. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and stent thrombosis following percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J*. 2009 Apr;30(8):916–22.
12. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, *et al*. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med*. 2009 Jan 22;360(4):354–62.
13. Frère C, Cuisset T, Gaborit B, Alessi M-C, Hulot J-S. The CYP2C19\*17 allele is associated with better platelet response to clopidogrel in patients admitted for non-ST acute coronary syndrome. *J Thromb Haemost JTH*. 2009 Aug;7(8):1409–11.
14. Sibbing D, Gebhard D, Koch W, Braun S, Stegherr J, Morath T, *et al*. Isolated and interactive impact of common CYP2C19 genetic variants on the antiplatelet effect of chronic clopidogrel therapy. *J Thromb Haemost JTH*. 2010 Aug;8(8):1685–93.



15. Tiroch KA, Sibbing D, Koch W, Roosen-Runge T, Mehilli J, Schömig A, *et al.* Protective effect of the CYP2C19 \*17 polymorphism with increased activation of clopidogrel on cardiovascular events. *Am Heart J.* 2010 Sep;160(3):506–12.
16. Sibbing D, Koch W, Gebhard D, Schuster T, Braun S, Stegherr J, *et al.* Cytochrome 2C19\*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation.* 2010 Feb 2;121(4):512–8.
17. Li Y, Tang H-L, Hu Y-F, Xie H-G. The gain-of-function variant allele CYP2C19\*17: a double-edged sword between thrombosis and bleeding in clopidogrel-treated patients. *J Thromb Haemost JTH.* 2012 Feb;10(2):199–206.
18. Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, Hulot J-S, Mega JL, Roden DM, *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther.* 2013 Sep;94(3):317–23.
19. Rakicevic L, Nestorovic A. Pharmacogenetics of Clopidogrel Therapy and Neurointerventional Procedures: We Need Precision Data for Precision Medicine. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2018 Jun 19 [cited 2018 Jul 16]; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cpt.1105>
20. Saiz-Rodríguez M, Romero-Palacián D, Villalobos-Vilda C, Caniego JL, Belmonte C, Koller D, *et al.* Influence of CYP2C19 Phenotype on the Effect of Clopidogrel in Patients Undergoing a Percutaneous Neurointervention Procedure. *Clin Pharmacol Ther.* 2019 Mar;105(3):661–71.
21. Caudle KE, Dunnenberger HM, Freimuth RR, Peterson JF, Burlison JD, Whirl-Carrillo M, *et al.* Standardizing terms for clinical pharmacogenetic test results: consensus terms from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2017 Feb;19(2):215–23.
22. Saiz-Rodríguez M, Ochoa D, Belmonte C, Román M, Vieira de Lara D, Zubiaur P, *et al.* Polymorphisms in CYP1A2, CYP2C9 and ABCB1 affect agomelatine pharmacokinetics. *J Psychopharmacol (Oxf).* 2019 Feb 21;026988111982795.
23. Rothman KJ. No adjustments are needed for multiple comparisons. *Epidemiol Camb Mass.* 1990 Jan;1(1):43–6.
24. Savitz DA, Olshan AF. Describing data requires no adjustment for multiple comparisons: a reply from Savitz and Olshan. *Am J Epidemiol.* 1998 May 1;147(9):813–814; discussion 815.
25. Thompson JR. Invited commentary: Re: 'Multiple comparisons and related issues in the interpretation of epidemiologic data'. *Am J Epidemiol.* 1998 May 1;147(9):801–6.
26. Fitzgerald DJ, Maree A. Aspirin and clopidogrel resistance. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2007;114–20.
27. Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, Shechter M, Beinart R, Bienart R, *et al.* Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2004 Jun 29;109(25):3171–5.
28. Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, *et al.* Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA.* 2009 Aug 26;302(8):849–57.
29. Saiz-Rodríguez M, Belmonte C, Abad-Santos F. CYP2C19 Ultrarapid Phenotype as a Risk Predictor of Subsequent Events During Clopidogrel Treatment in Patients Undergoing a Percutaneous Neurointervention. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2019 Jan 16 [cited 2019 Jan 18]; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cpt.1300>
30. Lin M, Todaro M, Chan J, Churilov L, Zhu WS, Ramdave S, *et al.* Association between CYP2C19 Polymorphisms and Outcomes in

- Cerebral Endovascular Therapy. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016 Jan;37(1):108–13.
31. Saiz-Rodríguez M, Romero-Palacián D, Villalobos-Vilda C, Caniego JL, Belmonte C, Koller D, *et al*. Influence of CYP2C19 Phenotype on the Effect of Clopidogrel in Patients Undergoing a Percutaneous Neurointervention Procedure. *Clin Pharmacol Ther*. 2018 Mar 14;
  32. Zhu W-Y, Zhao T, Xiong X-Y, Li J, Wang L, Zhou Y, *et al*. Association of CYP2C19 Polymorphisms with the Clinical Efficacy of Clopidogrel Therapy in Patients Undergoing Carotid Artery Stenting in Asia. *Sci Rep*. 2016 03;6:25478.
  33. Moore JM, Adeeb N, Shallwani H, Gupta R, Patel AS, Griessenauer CJ, *et al*. A Multicenter Cohort Comparison Study of the Safety, Efficacy, and Cost of Ticagrelor Compared to Clopidogrel in Aneurysm Flow Diverter Procedures. *Neurosurgery*. 2017 Oct 1;81(4):665–71.
  34. Harmsze A, van Werkum JW, Bouman HJ, Ruven HJ, Breet NJ, Ten Berg JM, *et al*. Besides CYP2C19\*2, the variant allele CYP2C9\*3 is associated with higher on-clopidogrel platelet reactivity in patients on dual antiplatelet therapy undergoing elective coronary stent implantation. *Pharmacogenet Genomics*. 2010 Jan;20(1):18–25.
  35. Rytkin E, Mirzaev KB, Grishina EA, Smirnov VV, Ryzhikova KA, Sozaeva ZA, *et al*. Do CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms and low CYP3A4 isoenzyme activity have an impact on stent implantation complications in acute coronary syndrome patients? *Pharmacogenomics Pers Med*. 2017;10:243–5.
  36. Ford NF. The Metabolism of Clopidogrel: CYP2C19 Is a Minor Pathway. *J Clin Pharmacol*. 2016;56(12):1474–83.
  37. Holmberg MT, Tornio A, Paile-Hyvärinen M, Tarkiainen EK, Neuvonen M, Neuvonen PJ, *et al*. CYP3A4\*22 Impairs the Elimination of Ticagrelor, But Has No Significant Effect on the Bioactivation of Clopidogrel or Prasugrel. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2018 Aug 20 [cited 2018 Oct 31]; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cpt.1177>
  38. Zhu H-J, Patrick KS, Yuan H-J, Wang J-S, Donovan JL, DeVane CL, *et al*. Two CES1 gene mutations lead to dysfunctional carboxylesterase 1 activity in man: clinical significance and molecular basis. *Am J Hum Genet*. 2008 Jun;82(6):1241–8.
  39. Lewis JP, Horenstein RB, Ryan K, O'Connell JR, Gibson Q, Mitchell BD, *et al*. The functional G143E variant of carboxylesterase 1 is associated with increased clopidogrel active metabolite levels and greater clopidogrel response. *Pharmacogenet Genomics*. 2013 Jan;23(1):1–8.
  40. Verschuren JJW, Boden H, Wessels JAM, van der Hoeven BL, Trompet S, Heijmans BT, *et al*. Value of platelet pharmacogenetics in common clinical practice of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2013 Sep 10;167(6):2882–8.
  41. Ancrenaz V, Desmeules J, James R, Fontana P, Reny J-L, Dayer P, *et al*. The paraoxonase-1 pathway is not a major bioactivation pathway of clopidogrel in vitro. *Br J Pharmacol*. 2012 Aug;166(8):2362–70.
  42. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Man M, Duvvuru S, Walker JR, *et al*. PON1 Q192R genetic variant and response to clopidogrel and prasugrel: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and a meta-analysis of clinical outcomes. *J Thromb Thrombolysis*. 2016 Apr;41(3):374–83.
  43. Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, *et al*. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics*. 2001 Apr;11(3):217–21.
  44. Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, *et al*. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Aug;70(2):189–99.

45. Sakaeda T, Nakamura T, Horinouchi M, Kakumoto M, Ohmoto N, Sakai T, *et al.* MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Res.* 2001 Oct;18(10):1400–4.
46. Kurata Y, Ieiri I, Kimura M, Morita T, Irie S, Urae A, *et al.* Role of human MDR1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther.* 2002 Aug;72(2):209–19.
49. Sridharan K, Kataria R, Tolani D, Bendkhale S, Gogtay NJ, Thatte UM. Evaluation of CYP2C19, P2Y12, and ABCB1 polymorphisms and phenotypic response to clopidogrel in healthy Indian adults. *Indian J Pharmacol.* 2016 Aug;48(4):350–4.
50. Cuisset T, Frere C, Quilici J, Morange P-E, Saut N, Lambert M, *et al.* Role of the T744C polymorphism of the P2Y12 gene on platelet response to a 600-mg loading dose of clopidogrel in 597 patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *Thromb Res.* 2007;120(6):893–9.
47. Sauer G, Kafka A, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, Deissler H. Basal expression of the multidrug resistance gene 1 (MDR-1) is associated with the TT genotype at the polymorphic site C3435T in mammary and ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Lett.* 2002 Nov 8;185(1):79–85.
48. Szymezak J, Moreau C, Lorient M-A, Durand E, Van Viet H, Desnos M, *et al.* High on-clopidogrel platelet reactivity: genotyping can help to optimize antiplatelet treatment. *Thromb Res.* 2011 Jul;128(1):92–5.
51. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Méneveau N, *et al.* Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2009 Jan 22;360(4):363–75.
52. Perneger TV. What's wrong with Bonferroni adjustments. *BMJ.* 1998 Apr 18;316(7139):1236–8.
53. Feise RJ. Do multiple outcome measures require p-value adjustment? *BMC Med Res Methodol.* 2002 Jun 17;2:8.

Supplementary table 1.

Gene	Variant	rs number	Reference allele	Alternative allele	MAF*	Consequence	Genotyping method
<b>ABCB1</b>	C3435T	rs1045642	G	A	0.4	Synonymous variant	MassArray
	G2677T/A	rs2032582	C	A	0.4	Missense variant	MassArray
	G2677T/A	rs2032582	C	T	0.05	Missense variant	MassArray
	C1236T	rs1128503	G	A	0.4	Synonymous variant	MassArray
<b>CYP1A2</b>	*1C	rs2069514	G	A	0.21	Upstream gene variant	TaqMan
	*1F	rs762551	A	C	0.37	Intron variant	MassArray
	*1B	rs2470890	T	C	(T) 0.24	Synonymous variant	MassArray
<b>CYP2B6</b>	*9	rs3745274	G	T	0.32	Missense variant	TaqMan
	*5	rs3211371	C	T	0.05	Missense variant	MassArray
<b>CYP2C8</b>	*2	rs11572103	T	A	0.05	Missense variant	MassArray
	*3	rs10509681	T	C	0.05	Missense variant	MassArray
	*4	rs1058930	G	C	0.02	Missense variant	MassArray
<b>CYP2C9</b>	*2	rs1799853	C	T	0.05	Missense variant	MassArray
	*3	rs1057910	A	C	0.05	Missense variant	MassArray
<b>CYP2C19</b>	*2	rs4244285	G	A	0.22	Synonymous variant	LightMix
	*3	rs4986893	G	A	0.01	Stop gained	LightMix
	*17	rs12248560	C	T	0.15	Intron variant	LightSNiP
<b>CYP3A4</b>	*20	rs67666821	—	T	<0.001	Frameshift variant	MassArray
	*22	rs35599367	G	A	0.09	Intron variant	MassArray
<b>CYP3A5</b>	*3	rs776746	T	C	(T) 0.38	Splice acceptor variant	MassArray
	*6	rs10264272	C	T	0.04	Synonymous variant	MassArray
<b>PON1</b>	Q192R	rs662	T	C	0.46	Missense variant	MassArray
	L55M	rs854560	A	T	0.18	Missense variant	MassArray
		rs705379	G	A	0.35	Upstream gene variant	TaqMan
<b>CES1</b>		rs71647871	C	T	0.04	Missense variant	MassArray
<b>P2RY12</b>		rs2046934	G	A	(G) 0.13	Intron variant	MassArray
		rs6798347	G	A	0.29	Intron variant	MassArray
		rs6809699	C	A	0.09	Synonymous variant	MassArray
		rs9859552	G	T	0.06	Intron variant	MassArray
		rs16846673	T	C	0.02	Missense variant	MassArray
		rs6785930	G	A	0.24	Missense variant	MassArray
		rs10935838	G	A	0.13	Intron variant	MassArray
		rs5853517	—	T	0.13	Intron variant	MassArray
		rs6801273	C	T	(C) 0.42	Intron variant	MassArray
		rs6787801	G	A	(G) 0.47	Intron variant	MassArray

\*Minor Allele Frequency (MAF) corresponds to the alternative allele, otherwise it is indicated in parentheses.

Supplementary table 2. Genotypic frequencies of the studied genes.

Gene	Genotype	N (%)	Gene	Genotype	N (%)	Gene	Genotype	N (%)	
CYP2C19	*1/*1	63 (43.8)	CYP3A4	*1/*1	123 (87.9)	P2RY12	rs6798347		
	*1/*2	28 (19.4)		*1/*22	16 (11.4)		G/G	88 (62.9)	
	*2/*2	2 (1.4)		*22/*22	1 (0.7)		G/A	46 (32.9)	
	*1/*17	37 (25.7)	rs662		A/A		6 (4.3)		
	*17/*17	7 (4.9)	T/T	65 (46.4)	rs6809699				
	*2/*17	7 (4.9)	T/C	56 (40.0)	C/C		105 (75.0)		
CYP1A2	*1/*1B	6 (4.2)	PON1	C/C	19 (13.6)		C/A	31 (22.1)	
	*1/*1F	11 (7.8)		rs854560			A/A	4 (2.9)	
	*1C/*1F	2 (1.4)		A/A	64 (45.7)		rs9859552		
	*1C/*1B	2 (1.4)		A/T	54 (38.6)		G/G	93 (66.4)	
	*1F/*1B	51 (36.4)		T/T	22 (15.7)		G/T	40 (28.6)	
	*1B/*1B	49 (35.0)		rs705379			T/T	7 (5.0)	
	*1C/*1C	1 (0.7)		G/G	31 (22.1)		rs16846673		
	*1F/*1F	18 (12.8)		G/A	69 (49.3)		T/T	140 (100)	
CYP2B6	*1/*1	62 (44.3)		CES1	A/A		40 (28.6)	rs6785930	
	*1/*5	16 (11.4)			rs71647871		G/G	70 (50.0)	
	*1/*9	45 (32.1)			C/C		138 (98.6)	G/A	61 (43.6)
	*5/*5	3 (2.1)	C/T	2 (1.4)	A/A		9 (6.4)		
	*5/*9	3 (2.1)	ABCB1	C3435T			rs10935838		
	*9/*9	11 (7.8)		C/C	41 (29.3)		G/G	103 (73.6)	
CYP2C9	*1/*1	71 (50.7)		C/T	80 (57.1)		G/A	33 (23.6)	
	*1/*2	39 (27.8)		T/T	19 (13.6)		A/A	4 (2.9)	
	*1/*3	21 (15.0)		C1236T			rs5853517		
	*2/*2	4 (2.9)		C/C	47 (33.6)		-/-	104 (74.3)	
	*2/*3	4 (2.9)		C/T	75 (53.6)		-/T	32 (22.9)	
	*3/*3	1 (0.7)		T/T	18 (12.9)		T/T	4 (2.9)	
CYP2C8	*1/*1	76 (54.3)		P2RY12	G2677TA		rs6801273		
	*1/*2	2 (1.4)			C/C		43 (30.7)	C/C	60 (42.9)
	*1/*3	41 (29.3)	C/A		74 (52.8)		C/T	66 (47.1)	
	*1/*4	13 (9.3)	C/T		8 (5.7)		T/T	14 (10.0)	
	*3/*3	3 (2.1)	A/A		14 (10.0)		rs6787801		
	*3/*4	5 (3.6)	A/T		1 (0.7)		G/G	39 (27.9)	
CYP3A5	*1/*3	16 (11.4)	P2RY12		rs2046934		G/A	62 (44.3)	
	*1/*6	1 (0.7)			G/G		104 (74.3)	A/A	39 (27.9)
	*3/*3	121 (86.4)			G/A		32 (22.9)		
	*3/*6	2 (1.4)			A/A		4 (2.9)		

## ANEXO II. OTRAS PUBLICACIONES EN FARMACOGENÉTICA

### ARTÍCULO 4: Polymorphisms in CYP1A2, CYP2C9 and ABCB1 affect agomelatine pharmacokinetics

Saiz-Rodríguez M, Ochoa D, Herrador C, Belmonte C, Román M, Vieira de Lara D, Zubiaur P, Koller D, Mejía G, Abad-Santos F.

J Psychopharmacol. 2019 Apr;33(4):522-531. doi: 10.1177/0269881119827959.

**Factor de impacto: 4.78**

#### RESUMEN

**BACKGROUND:** Agomelatine is an agonist of the melatoninerger receptors used for the treatment of depression. Our aim was to evaluate the effect of genetic polymorphisms in metabolising enzymes and the P-glycoprotein transporter on agomelatine pharmacokinetics and pharmacodynamics.

**METHODS:** Twenty-eight healthy volunteers receiving a single 25 mg oral dose of agomelatine, were genotyped for nine polymorphisms in cytochrome P450 enzymes (CYP1A2, CYP2C9 and CYP2C19) and adenosine triphosphate-binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1), by real-time polymerase chain reaction. Agomelatine concentrations were measured by high performance liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometry detector.

**RESULTS:** We calculated a CYP1A2 activity score that was directly correlated with agomelatine pharmacokinetics. Individuals with a decreased enzyme activity (\*1C carriers) had a lower clearance and accumulated higher concentrations of agomelatine. In contrast, individuals with a high CYP1A2 inducibility (\*1F or \*1B carriers) showed an extensive clearance and lower agomelatine concentrations. The apparently marked differences between races were due to the different CYP1A2 genotype distribution. CYP2C9 intermediate/poor metabolisers showed a higher area under the concentration-time curve and maximum concentration. ABCB1 G2677T/A polymorphism affected the time to reach maximum concentration, as subjects carrying A/A+A/T genotypes showed higher values. No association was found for CYP2C19 phenotype. Agomelatine did not produce any change in blood pressure, heart rate or QT interval.

**CONCLUSIONS:** CYP1A2 polymorphisms affect agomelatine pharmacokinetics. CYP1A2 phenotype inferred from the genotyping of CYP1A2\*1C, \*1F and \*1B alleles might be a potential predictor of agomelatine exposure. ABCB1 G2677T/A could affect agomelatine absorption, as subjects with A/A+A/T genotypes had lower agomelatine concentration and they take more time to reach the maximum concentration.

## **ARTÍCULO 5: Influence of thiopurine S-methyltransferase polymorphisms in mercaptopurine pharmacokinetics in healthy volunteers**

Saiz-Rodríguez M, Ochoa D, Belmonte C, Román M, Martínez-Ingelmo C, Ortega-Ruiz L, Sarmiento-Iglesias C, Herrador C, Abad-Santos F.

Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2019 Apr;124(4):449-455. doi: 10.1111/bcpt.13153.

**Factor de impacto: 3.17**

### **RESUMEN**

Mercaptopurine is a drug commonly used in the treatment of different types of cancer, especially acute lymphoblastic leukaemia, and autoimmune diseases such as ulcerative colitis or Crohn's disease and in patients receiving organ transplants. It is metabolized by three cytosolic enzymes. One of them, thiopurine-S-methyltransferase (TPMT), is responsible for catalysing the methylation reaction of mercaptopurine to 6-methyl-mercaptopurine, thus inactivating the drug. Individuals with *TPMT* loss-of-function alleles (\*2, \*3A, \*3B or \*3C) can be extremely sensitive to the effect of mercaptopurine, since it can be accumulated, therefore producing haematological toxicity. The objective of this study was to evaluate the role of *TPMT* polymorphisms on the pharmacokinetics of mercaptopurine. For that purpose, we used collected pharmacokinetic data from 48 healthy volunteers (all males) who received a single oral dose of mercaptopurine 50 mg in two bioequivalence studies. The volunteers were subsequently genotyped for *TPMT* \*2, \*3A, \*3B and \*3C alleles by real-time PCR. There were 4 carriers (8.3%) of *TPMT*\*2 and *TPMT*\*3A alleles. Mercaptopurine elimination was affected by *TPMT* loss-of-function polymorphisms, since heterozygous subjects show 18% higher half-life compared to wild-type individuals. This fact is consistent with the expected since the presence of loss-of-function alleles decreases *TPMT* enzymatic activity and, thus, affects mercaptopurine elimination. Moreover, mercaptopurine pharmacokinetic parameters were different among races, since Latin showed higher plasma concentrations and lower clearance compared to Caucasians. This fact might be due to a different distribution of polymorphisms in genes, other than *TPMT*, that also influence the pharmacokinetics of mercaptopurine.

## **ARTÍCULO 6: Polymorphisms associated with fentanyl pharmacokinetics, pharmacodynamics and adverse effects.**

Saiz-Rodríguez M, Ochoa D, Herrador C, Belmonte C, Román M, Alday E, Koller D, Zubiaur P, Mejía G, Hernández-Martínez M, Abad-Santos F.

Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2019 Mar;124(3):321-329. doi: 10.1111/bcpt.13141

**Factor de impacto: 3.17**

### **RESUMEN**

Fentanyl is an agonist of the  $\mu$ -opioid receptor commonly used in the treatment of moderate-severe pain. In order to study whether pharmacogenetics explain some of the variability in the response to fentanyl, several genes related to fentanyl receptors, transporters and metabolic enzymes have been analysed. Thirty-five healthy volunteers (19 men and 16 women) receiving a single 300  $\mu$ g oral dose of fentanyl were genotyped for 9 polymorphisms in cytochrome P450 (CYP) enzymes (CYP3A4 and CYP3A5), ATP binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1), opioid receptor  $\mu$  1 (OPRM1), catechol-O-methyltransferase (COMT) and adrenoceptor beta 2 (ADRB2) by real-time PCR. Fentanyl concentrations were measured by ultra-performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Fentanyl pharmacokinetics is affected by sex. Carriers of the CYP3A4\*22 allele, which is known to reduce the mRNA expression, showed higher area under the concentration-time curve (AUC) and lower clearance (Cl) values. Although this finding might be of importance, its validity needs to be confirmed in other similar settings. Furthermore carriers of the ABCB1 C1236T T/T genotype presented a lower AUC and higher Cl, as well as lower half-life ( $T_{1/2}$ ). As subjects were blocked with naltrexone, the effect of fentanyl on pharmacodynamics might be biased; however, we could observe that fentanyl had a hypotensive effect. Moreover, ADRB2 C523A A allele carriers showed a tendency towards reducing systolic blood pressure. Likewise, OPRM1 and COMT minor allele variants were risk factors for development of somnolence. CYP3A5\*3, ABCB1 C3435T and ABCB1 G2677T/A were not associated with fentanyl's pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety profile.



## **ARTÍCULO 7: Effect of ABCB1 C3435T Polymorphism on Pharmacokinetics of Antipsychotics and Antidepressants.**

Saiz-Rodríguez M, Belmonte C, Román M, Ochoa D, Jiang-Zheng C, Koller D, Mejía G, Zubiaur P, Wojnicz A, Abad-Santos F.

Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2018 Oct;123(4):474-485. doi: 10.1111/bcpt.13031.

### **Factor de impacto: 3.17**

#### **RESUMEN:**

P-glycoprotein, encoded by ABCB1, is an ATP-dependent drug efflux pump which exports substances outside the cell. Some studies described connections between C3435T polymorphism T allele and lower P-glycoprotein expression; therefore, homozygous T/T could show higher plasma levels. Our aim was to evaluate the effect of C3435T on pharmacokinetics of 4 antipsychotics (olanzapine, quetiapine, risperidone and aripiprazole) and 4 antidepressants (trazodone, sertraline, agomelatine and citalopram). The study included 473 healthy volunteers receiving a single oral dose of one of these drugs, genotyped by real-time PCR. Multivariate analysis was performed to adjust the effect of sex and genotype of the main cytochrome P450 enzymes. C3435T polymorphism had an effect on olanzapine pharmacokinetics, as T/T individuals showed lower clearance and volume of distribution. T/T individuals showed lower T<sub>1/2</sub> of 9-OH-risperidone, but this difference disappeared after multivariate correction. T/T homozygous individuals showed lower dehydro-aripiprazole and trazodone area under the concentration-time curve, along with lower half-life and higher clearance of trazodone. C/T genotype was associated to higher citalopram maximum concentration. C3435T had no effect on quetiapine, sertraline or agomelatine pharmacokinetics. C3435T can affect the elimination of some drugs in different ways. Regarding risperidone, trazodone and dehydro-aripiprazole, we observed enhanced elimination while it was reduced in olanzapine and citalopram. However, in quetiapine, aripiprazole, sertraline and agomelatine, no changes were detected. These results suggest that P-glycoprotein polymorphisms could affect CNS drugs disposition, but the genetic factor that alters its activity is still unknown. This fact leads to consider the analysis of ABCB1 haplotypes instead of individual variants.

## **ARTÍCULO 8: Effect of Polymorphisms on the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Safety of Sertraline in Healthy Volunteers.**

Saiz-Rodríguez M, Belmonte C, Román M, Ochoa D, Koller D, Talegón M, Ovejero-Benito MC, López-Rodríguez R, Cabaleiro T, Abad-Santos F.

Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2018 May;122(5):501-511. doi: 10.1111/bcpt.12938.

**Factor de impacto: 3.17**

### **RESUMEN:**

Sertraline is a selective serotonin reuptake inhibitor widely metabolized in the liver by cytochrome P450 (CYP) enzymes. Besides, it is a P-glycoprotein substrate. Moreover, serotonin transporters and serotonin receptors are involved in its efficacy and safety. The aim of this study was to evaluate the role of polymorphisms of metabolizing enzymes, transporters and receptors on the pharmacokinetics, pharmacodynamics and tolerability of sertraline in healthy volunteers. Forty-six healthy volunteers (24 men and 22 women) receiving a 100-mg single oral dose of sertraline were genotyped for 17 genetic variants of CYP enzymes (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6), ATP-binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1), solute carrier family 6 member 4 (SLC6A4), 5-hydroxytryptamine receptor 2A (HTR2A) and 5-hydroxytryptamine receptor 2C (HTR2C) genes. Pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters were similar in men and women. Polymorphisms in CYP2C19 and CYP2B6 genes influenced sertraline pharmacokinetics, with a greater effect of CYP2C19. Individuals carrying defective alleles for CYP2C19 and CYP2B6 showed higher area under the curve (AUC) and half-life ( $T_{1/2}$ ). Moreover, CYP2C19\*17 was related to a decreased AUC and  $T_{1/2}$ . No significant effect was found for polymorphisms in CYP2C9, CYP2D6 and ABCB1 on sertraline pharmacokinetics. Sertraline had a small heart rate-lowering effect, directly related to maximum concentration ( $C_{max}$ ) and the presence of ABCB1 minor alleles. Sertraline had no significant effect on blood pressure and QTc. There was a tendency to present more adverse drug reactions in women and individuals with higher AUC of sertraline, such as CYP2C19 intermediate metabolizers and CYP2B6 G516T T/T individuals.

**ARTÍCULO 9: Pharmacogenetics of trazodone in healthy volunteers: association with pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety.**

Saiz-Rodríguez M, Belmonte C, Derqui-Fernández N, Cabaleiro T, Román M, Ochoa D, Talegón M, Ovejero-Benito MC, Abad-Santos F.

Pharmacogenomics. 2017 Nov;18(16):1491-1502. doi: 10.2217/pgs-2017-0116.2017

**Factor de impacto: 2.35**

**RESUMEN:**

**AIM:** The aim was to evaluate the effect of polymorphisms in metabolizing enzymes and transporters on the pharmacokinetics, pharmacodynamics and adverse effects of trazodone in healthy volunteers.

**MATERIALS & METHODS:** 36 healthy volunteers receiving a single 100-mg oral dose of trazodone were genotyped for 11 variants in CYP3A4, CYP3A5, CYP2D6 and ABCB1 by real-time PCR. Plasma concentrations were measured using liquid chromatography-tandem mass spectrometry method.

**RESULTS & CONCLUSION:** Sex affected the pharmacokinetics of trazodone with higher clearance in women. Polymorphisms in ABCB1, but not in CYP3A or CYP2D6, influenced trazodone pharmacokinetics. Trazodone decreased blood pressure and prolonged the corrected QT interval. CYP2D6 and ABCB1 polymorphisms were associated with the incidence of dizziness and prolonged corrected QT interval, respectively. Subjects with adverse drug reactions had lower concentrations of trazodone suggesting its metabolite (m-chlorophenylpiperazine) could be responsible for these effects.

**ARTÍCULO 10: Simultaneous determination of six antipsychotics, two of their metabolites and caffeine in human plasma by LC-MS/MS using a phospholipid-removal microelution-solid phase extraction method for sample preparation.**

Koller D, Zubiaur P, Saiz-Rodríguez M, Abad-Santos F, Wojnicz A,

Talanta. 2019 Jun 1;198:159-168. doi:10.1016/j.talanta.2019.01.112.

**Factor de impacto: 4.244**

**RESUMEN:**

A simple and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was developed and validated in human plasma for the simultaneous determination of aripiprazole (ARI) and its metabolite dehydro-aripiprazole (DARI); olanzapine (OLA), risperidone (RIS), paliperidone (PAL), quetiapine (QUE), clozapine (CLO) and caffeine (CAF). CAF is included to the method because it can have an influence on drug metabolism due to competitive inhibition. The above mentioned compounds and their isotope-labeled internal standards were extracted from 200  $\mu$ L human plasma samples by both, effective phospholipids-eliminating three-step microelution- solid-phase extraction ( $\mu$ -SPE) and protein precipitation (PPT) for comparison. A combination of formic acid (0.2%)-acetonitrile (pH 3.0; 65:35, v/v) was used as mobile phase and the chromatogram was run under gradient conditions at a flow rate of 0.6 mL/min. Run time lasted 6 min, followed by a re-equilibration time of 3 min. All analytes were monitored by mass spectrometric detection operating in multiple reaction monitoring mode and the method was validated covering the corresponding therapeutic ranges: 0.18–120 ng/mL for ARI, 0.25–80 ng/mL for DARI, 1.00–100 ng/mL for OLA, 0.70–60 ng/mL for RIS, 0.20–30 ng/mL for PAL, 0.50–160 ng/mL for QUE, 0.50–1000 ng/mL for CLO, and finally 1200–3700 ng/mL for CAF. The method was validated based on the recommendations of regulatory agencies through tests of precision, accuracy, extraction recovery, identity confirmation, trueness, matrix effect, process efficiency, stability, selectivity, linearity and carry-over effect fulfilling the guideline requirements. Our  $\mu$ -SPE method results in the elimination of more than 99% of early eluting and more than 92% of late-eluting phospholipids compared to PPT. Additionally, the method was successfully applied for quantifying ARI and OLA plasma concentrations from healthy volunteers.

## **ARTÍCULO 11: How to make P-glycoprotein (ABCB1/MDR1) harbor mutations and measure its expression and activity in cell cultures?**

Zubiaur P, Saiz-Rodríguez M, Koller D, Ovejero-Benito MC, Wojnicz A, Abad-Santos F.

Pharmacogenomics. 2018 Nov;19(16):1285-1297. doi: 10.2217/pgs-2018-0101.

**Factor de impacto: 2.35**

### **RESUMEN**

Several polymorphisms have been identified in ABCB1, the gene encoding for the P-glycoprotein. This transporter alters the pharmacokinetics or effectiveness of drugs by excreting them from cells where it is expressed (e.g., blood-brain barrier, intestine or tumors). No consensus has been reached regarding the functional consequences of these polymorphisms in the transporter's function. The aim of this review was to describe a methodology that allows the assessment of P-gp function when harboring polymorphisms. We describe how to obtain cell lines with high expression levels of the transporter with polymorphisms and several tactics to measure its expression and activity. This methodology may help elucidate the contribution of polymorphisms in ABCB1 to drug pharmacokinetics, effectiveness and safety or to cancer chemotherapy failure.

**ARTÍCULO 12: Influence of CYP2B6 activity score on the pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of single dose efavirenz in healthy volunteers.**

Zubiaur P, Saiz-Rodríguez M, Ochoa D, Belmonte C, Román M, Mejía G, Martín-Vilchez S, Abad-Santos F.

Pharmacogenomics Journal. 2018 (En revisión)

**Factor de impacto: 3.812**

**RESUMEN**

Efavirenz is a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor used as first line therapy for the treatment of HIV infection. Cytochrome P450 (CYP) CYP2B6 G516T (rs3745274) is a well-known predictor of efavirenz disposition. Dose adjustment based on G516T variant has been shown to be beneficial. However, this variant cannot explain the entire variability of efavirenz pharmacokinetics. In this study, we evaluated the influence of 11 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in CYP2B6, CYP2A6, CYP3A and ABCB1 (ATP-binding cassette sub-family B member 1) on the pharmacokinetics and safety of efavirenz after single oral dose administration to 47 healthy volunteers. We designed and validated a CYP2B6 activity score model based on two CYP2B6 SNPs (G516T, rs4803419) that predicted efavirenz disposition better than G516T alone.

### **ARTÍCULO 13: Effects of aripiprazole on pupillometric parameters related to pharmacokinetics and pharmacogenetics after single oral administration to healthy subjects**

Koller D, Belmonte C, Lubomirov R, Saiz-Rodríguez M, Román M, Ochoa D, Carcas AJ, Wojnicz A, Abad-Santos F.

J Psychopharmacol. 2018 Nov;32(11):1212-1222. doi: 10.1177/0269881118798605.

**Factor de impacto: 4.78**

#### **RESUMEN**

**BACKGROUND:** Pupillometry is used for the detection of autonomic dysfunction related to numerous diseases and drug administration. Genetic variants in cytochrome P450 (CYP2D6, CYP3A4), dopamine receptor (DRD2, DRD3), serotonin receptor (HTR2A, HTR2C) and ATP-binding cassette subfamily B (ABCB1) genes were previously associated with aripiprazole response.

**AIMS:** Our aim was to evaluate if aripiprazole affects pupil contraction and its relationship with pharmacokinetics and pharmacogenetics.

**METHODS:** Thirty-two healthy volunteers receiving a 10 mg single oral dose of aripiprazole were genotyped for 15 polymorphisms in ABCB1, CYP2D6, DRD2, DRD3, HTR2A and HTR2C genes by reverse transcription polymerase chain reaction. Aripiprazole and dehydro-aripiprazole plasma concentrations were measured by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Pupil examination was performed by automated pupillometry.

**RESULTS:** Aripiprazole caused pupil constriction and reached the peak value at C<sub>max</sub>. HTR2A rs6313 T allele carriers and HTR2C rs3813929 C/T subjects showed higher maximum constriction velocity and maximum pupil diameter. Besides, Gly/Gly homozygotes for DRD3 rs6280 showed significantly lower maximum constriction velocity values. A/G heterozygotes for DRD2 rs6277 showed higher total time taken by the pupil to recover 75% of the initial resting size values. CYP2D6 intermediate metabolisers showed higher area under the curve, C<sub>max</sub> and T<sub>1/2</sub> than extensive metabolisers. ABCB1 G2677T/A A/A homozygotes had greater T<sub>1/2</sub> in comparison with C/C homozygotes. ABCB1 C3435T T allele carriers and C1236T C/T subjects showed greater area under the curve than C/C homozygotes.

#### **CONCLUSIONS:**

Aripiprazole affects pupil contraction, which could be a secondary effect through dopamine and serotonin receptors. Pupillometry could be a useful tool to assess autonomic nervous system activity during antipsychotic treatment.

## **ARTÍCULO 14: Histone modifications associated with biological drug response in moderate-to-severe psoriasis.**

Ovejero-Benito MC, Reolid A, Sánchez-Jiménez P, Saiz-Rodríguez M, Muñoz-Aceituno E, Llamas-Velasco M, Martín-Vilchez S, Cabaleiro T, Román M, Ochoa D, Daudén E, Abad-Santos F.

Exp Dermatol. 2018 Dec;27(12):1361-1371.doi: 10.1111/exd.13790.

### **Factor de impacto: 2.6**

#### **RESUMEN**

**INTRODUCTION:** Epigenetic factors play an important role in psoriasis onset and development. Biological drugs are used to treat moderate-to-severe psoriasis patients resistant to conventional systemic drugs. Although they are safe and effective, some patients do not respond to them. Therefore, it is necessary to find biomarkers that could predict response to these therapies.

**OBJECTIVE:** To find epigenetic biomarkers that could predict response to biological drugs (ustekinumab, secukinumab, adalimumab, ixekizumab).

**MATERIALS AND METHODS:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 39 psoriasis patients treated with biological therapies before and after drug administration and from 42 healthy subjects. Afterwards, histones were extracted from PBMCs. Four histone modifications (H3 and H4 acetylation, H3K4 and H3K27 methylation) were determined by ELISA. Data were analysed by IBM-SPSS v.23.

**RESULTS AND CONCLUSIONS:** Psoriasis patients presented reduced levels of acetylated H3 and H4 and increased levels of methylated H3K4 compared to controls. Non-significant changes were observed after treatment administration in any of the histone modifications analysed. Nevertheless, significant changes in methylated H3K27 were found between responders and non-responders to biological drugs at 3 months. As 28% of these patients also presented psoriatic arthritis (PsA), the former analysis was repeated in the subsets of patients with or without PsA. In patients without PsA significant changes in methylated H3K4 were found between responders and non-responders to biological drugs at 3 and 6 months. Although further studies should confirm these results, these findings suggest that H3K27 and H3K4 methylation may contribute to patients' response to biological drugs in psoriasis.



## **ARTÍCULO 15: Influence of CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5 and ABCB1 Polymorphisms on Pharmacokinetics and Safety of Aripiprazole in Healthy Volunteers.**

Belmonte C, Ochoa D, Román M, Saiz-Rodríguez M, Wojnicz A, Gómez-Sánchez CI, Martín-Vílchez S, Abad-Santos F.

Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2018 Jun;122(6):596-605. doi: 10.1111/bcpt.12960.

### **Factor de impacto: 3.17**

#### **RESUMEN:**

The aim of this study was to investigate the effect of polymorphisms in cytochrome P450 (CYP) 2D6, CYP3A4 and CYP3A5 enzymes and in P-glycoprotein (P-gp) on the pharmacokinetics and safety of aripiprazole and, its active metabolite, dehydro-aripiprazole, in 148 healthy volunteers from six bioequivalence trials receiving a single oral dose of aripiprazole. The plasma concentrations of both analytes were measured by LC-MS/MS. CYP2D6 (\*3,\*4,\*5,\*6,\*7,\*9 and copy number variations), CYP3A4 (\*20 and \*22), CYP3A5\*3 and C3435T, C1236T and G2677T/A in ABCB1 gene were determined. As the number of active CYP2D6 alleles decreased,  $AUC_{0-t}$ ,  $C_{max}$  and  $t_{1/2}$  of aripiprazole were higher and clearance of aripiprazole,  $AUC_{0-t}$  of dehydro-aripiprazole and ratio dehydro-aripiprazole/aripiprazole were lower.  $AUC_{0-t}$  of aripiprazole of poor metabolizer (PM) subjects was increased by 50% compared to extensive metabolizers (EM), and  $AUC_{0-t}$  of dehydro-aripiprazole was decreased by 33%. ABCB1 1236TT subjects had a lower clearance of aripiprazole ( $p = 0.023$ ) and  $AUC_{0-t}$  ( $p = 0.039$ ) and  $C_{max}$  of dehydro-aripiprazole ( $p = 0.036$ ) compared to C/C. CYP3A5\*3/\*3 subjects had a 10% lower ratio dehydro-aripiprazole/aripiprazole than \*1/\*3 ( $p = 0.019$ ). Adverse drug reactions (ADRs) had a directly proportional relationship with  $AUC_{0-t}$  of aripiprazole ( $p = 0.001$ ), especially nausea/vomiting, which were more common in women ( $p = 0.005$ ). Women and CYP3A5\*1/\*1 subjects showed more often dizziness ( $p = 0.034$ ;  $p = 0.009$ ). Pharmacokinetics of aripiprazole is affected by CYP2D6 phenotype but also by sex and C1236T (ABCB1 gene), while dehydro-aripiprazole pharmacokinetics is affected by CYP2D6 and C1236T. The ratio dehydro-aripiprazole/aripiprazole was influenced by CYP2D6 phenotype and CYP3A5\*3. Concentrations of aripiprazole, sex, CYP3A5\*3 and CYP2D6 were involved in the development of ADRs.

**ARTÍCULO 16: Polymorphisms associated with adalimumab and infliximab response in moderate-to-severe plaque psoriasis.**

Ovejero-Benito MC, Prieto-Pérez R, Llamas-Velasco M, Muñoz-Aceituno E, Reolid A, Saiz-Rodríguez M, Belmonte C, Román M, Ochoa D, Talegón M, Cabaleiro T, Daudén E, Abad-Santos F.

Pharmacogenomics. 2018 Jan;19(1):7-16. doi: 10.2217/pgs-2017-0143.

**Factor de impacto: 2.35**

**RESUMEN:**

**AIM:** This study evaluated the influence of pharmacogenetics in psoriatic patients treated with adalimumab and/or infliximab.

**MATERIALS & METHODS:** Prospective observational study evaluating the association of 124 polymorphisms with the response to adalimumab or infliximab (PASI75) in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis at 3 months (n = 95) and 6 months of treatment (n = 90). Significant SNPs for univariate analysis were subjected to multivariate analysis.

**RESULTS:** Five SNPs were associated with PASI75 at 3 months: rs6661932 (IVL), rs2546890 (IL-12B), rs2145623 (NFKBIA), rs9304742 (ZNF816A) and rs645544 (SLC9A8). Furthermore, rs1061624 (TNFR1B) was associated with PASI75 at 6 months.

**CONCLUSION:** Nevertheless, these biomarkers should be validated in large-scale studies before implementation in clinical practice.

## **ARTÍCULO 17: Pharmacogenetics and Pharmacogenomics in Moderate-to-Severe Psoriasis.**

Ovejero-Benito MC, Muñoz-Aceituno E, Reolid A, Saiz-Rodríguez M, Abad-Santos F, Daudén E.

Am J Clin Dermatol. 2018 Apr;19(2):209-222. doi: 10.1007/s40257-017-0322-9.

**Factor de impacto: 2.755**

### **RESUMEN:**

Pharmacogenetics is the study of variations in DNA sequence related to drug response. Moreover, the evolution of biotechnology and the sequencing of human DNA have allowed the creation of pharmacogenomics, a branch of genetics that analyzes human genes, the RNAs and proteins encoded by them, and the inter-and intra-individual variations in expression and function in relation to drug response. Pharmacogenetics and pharmacogenomics are being used to search for biomarkers that can predict response to systemic treatments, including those for moderate-to-severe psoriasis. Psoriasis is a chronic inflammatory disease with an autoimmune contribution. Although its etiology remains unknown, genetic, epigenetic, and environmental factors play a role in its development. Diverse systemic and biologic therapies are used to treat moderate-to-severe psoriasis. However, these treatments are not curative, and patients exhibit a wide range of responses to them. Moderate-to-severe psoriasis is usually treated with systemic immunomodulators such as acitretin, ciclosporin, and methotrexate. Anti-tumor necrosis factor (TNF) drugs (adalimumab, etanercept, or infliximab) are the first-line treatment for patients resistant to conventional systemic therapies. Although these therapies are very efficient, around 30-50% of patients have inadequate response. Ustekinumab is a monoclonal antibody that targets interleukin (IL)-12 and IL-23 and is used for moderate-to-severe psoriasis. New drugs (apremilast, brodalumab, guselkumab, ixekizumab, and secukinumab) have recently been approved for psoriasis. However, response rates to systemic treatments for moderate-to-severe psoriasis range from 35 to 80%, so it is necessary to identify non-invasive biomarkers that could help predict treatment outcomes of these therapies and individualize care for patients with psoriasis. These biomarkers could improve patient quality of life and reduce health costs and potential side effects. Pharmacogenetic studies have identified potential biomarkers for response to biologic treatments for moderate-to-severe psoriasis. These biomarkers need to be validated in clinical trials involving large cohorts of patients before they can be translated to the clinic. We review pharmacogenetics and pharmacogenomics studies for the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis.

**ARTÍCULO 18: Polymorphisms associated with etanercept response in moderate-to-severe plaque psoriasis.**

Ovejero-Benito MC, Prieto-Pérez R, Llamas-Velasco M, Belmonte C, Cabaleiro T, Román M, Ochoa D, Talegón M, Saiz-Rodríguez M, Daudén E, Abad-Santos F.

Pharmacogenomics. 2017 May;18(7):631-638. doi: 10.2217/pgs-2017-0014.

**Factor de impacto: 2.35**

**RESUMEN:**

**AIM:** Few studies have evaluated the influence of pharmacogenetics in psoriatic patients treated with etanercept.

**MATERIALS & METHODS:** We evaluated the association between 124 polymorphisms with the response to etanercept in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis at 3 months (n = 78) and 6 months of treatment (n = 68).

**RESULTS:** The results of the multivariate analysis showed an association between polymorphisms rs13437088 (HLA-B/MICA), rs96844 (MAP3K1), rs2431697 (PTTG1), rs9304742 (ZNF816A) and the response to etanercept at 3 months. Besides polymorphisms rs928655 (GBP6) and rs2546890 (IL12B) were associated to response at 6 months.

**CONCLUSIONS:** Nevertheless, these biomarkers should be validated in large-scale studies before its implementation in clinical practice.

**ARTÍCULO 19: Epigenetic biomarkers associated with antitumour necrosis factor drug response in moderate-to-severe psoriasis.**

Ovejero-Benito MC, Cabaleiro T, Sanz-García A, Llamas-Velasco M, Saiz-Rodríguez M, Prieto-Pérez R, Talegón M, Román M, Ochoa D, Reolid A, Daudén E, Abad-Santos F.

Br J Dermatol. 2018 Mar;178(3):798-800. doi: 10.1111/bjd.15504.

**Factor de impacto: 4.70**

Research letter. No abstract available.

No tengo fuerzas, para rendirme  
No tengo tiempo, para esperar  
No sé si habrá, algún camino  
O si algún día, podré llegar

Gritar sin voz, por las calles vacías  
Mientras quede una nota por tocar  
Las nubes negras, siempre me guían  
A un lugar al que llamar hogar

He perdido con dos ases  
He soñado con volver  
El silencio no lo llenan  
Los compases

Voy a coger el 6 con destino a mi destino  
Voy a olvidar lo que he aprendido  
En cada kilómetro  
En cada latido

Canción "Amoxicilina" -La M.O.D.A -

